

Biotoxinas marinas

**ESTUDIO FAO:
ALIMENTACIÓN Y
NUTRICIÓN**

**Organización de
las Naciones
Unidas para la
Agricultura y la
Alimentación**



Los puntos de vista expresados en esta publicación son los del autor (res) y no reflejan necesariamente los de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación ni los de la Organización Mundial de la Salud.

Las denominaciones empleadas en esta publicación y la forma en que aparecen presentados los datos que contiene no implican, de parte de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación o de la Organización Mundial de la Salud, juicio alguno sobre la condición jurídica o nivel de desarrollo de países, territorios, ciudades o zonas, o de sus autoridades, ni respecto de la delimitación de sus fronteras o límites. La palabra “países” en el texto debe entenderse como refiriéndose sin distinción alguna a países, territorios y áreas.

Todos los derechos reservados. Se autoriza la reproducción y difusión del material contenido en este producto informativo para fines educativos u otros fines no comerciales sin previa autorización escrita de los titulares de los derechos de autor, siempre que se especifique claramente la fuente. Se prohíbe la reproducción del material contenido en este producto informativo para reventa u otros fines comerciales sin previa autorización escrita de los titulares de los derechos de autor. Las peticiones para obtener tal autorización deberán dirigirse al Jefe del Servicio de Gestión de las Publicaciones de la Dirección de Información de la FAO, Viale delle Terme di Caracalla, 00100 Roma, Italia, o por correo electrónico a copyright@fao.org

Índice

1.	Introducción	1
2.	Intoxicación paralítica por mariscos (PSP)	5
2.1	Estructuras químicas y propiedades	5
2.2	Métodos de análisis	6
2.3	Organismos fuente y habitat	14
2.4	Presencia y acumulación en frutos del mar	18
2.5	Toxicidad de las toxinas PSP	24
2.6	Prevención de la intoxicación por PSP	32
2.7	Casos y brotes de PSP	36
2.8	Reglamentación y seguimiento	49
3.	Intoxicación diarreica por mariscos (DSP).....	53
3.1	Estructuras químicas y propiedades	53
3.2	Métodos de análisis	57
3.3	Organismos fuente y habitat	66
3.4	Presencia y acumulación en frutos del mar	68
3.5	Toxicidad de las toxinas DSP	71
3.6	Prevención de la intoxicación por DSP	79
3.7	Casos y brotes de DSP	81
3.8	Reglamentación y seguimiento	92
4.	Intoxicación amnésica por mariscos (ASP)	97
4.1	Estructuras químicas y propiedades	97
4.2	Métodos de análisis	99
4.3	Organismos fuente y habitat	105
4.4	Presencia y acumulación en frutos del mar	110
4.5	Toxicidad de las toxinas ASP	114
4.6	Prevención de la intoxicación por ASP	121
4.7	Casos y brotes de ASP	123
4.8	Reglamentación y seguimiento	133
5.	Intoxicación neurológica por mariscos (NSP)	137
5.1	Estructuras químicas y propiedades	137
5.2	Métodos de análisis	140
5.3	Organismos fuente y habitat	145
5.4	Presencia y acumulación en frutos del mar	148
5.5	Toxicidad de las toxinas NSP	150
5.6	Prevención de la intoxicación por NSP	161
5.7	Casos y brotes de NSP	164
5.8	Reglamentación y seguimiento	170

6.	Intoxicación azaspiracida por mariscos (AZP)	173
6.1	Estructuras químicas y propiedades	173
6.2	Métodos de análisis	174
6.3	Organismos fuente y habitat	176
6.4	Presencia y acumulación en frutos del mar	177
6.5	Toxicidad de las toxinas AZP	178
6.6	Prevención de la intoxicación por AZP	180
6.7	Casos y brotes de AZP	181
6.8	Reglamentación y seguimiento	184
7.	Intoxicación ciguatera por pescados (CFP)	185
7.1	Estructuras químicas y propiedades	185
7.2	Métodos de análisis	187
7.3	Organismos fuente y habitat	192
7.4	Presencia y acumulación en frutos del mar	194
7.5	Toxicidad de las toxinas CFP	197
7.6	Prevención de la intoxicación por CFP	206
7.7	Casos y brotes de CFP	207
7.8	Reglamentación y seguimiento	217
8.	Evaluación de riesgos	219
8.1	Evaluación de riesgos para la intoxicación paralítica por mariscos (PSP)	219
8.2	Evaluación de riesgos para la intoxicación diarreica por mariscos (DSP)	219
8.3	Evaluación de riesgos para la intoxicación amnésica por mariscos (ASP)	221
8.4	Evaluación de riesgos para la intoxicación neurológica por mariscos (NSP)	221
8.5	Evaluación de riesgos para la intoxicación azaspiracido por mariscos (AZP)	221
8.6	Evaluación de riesgos para la intoxicación ciguatera en pescado (CFP)	222
8.7	Comentarios finales	222
9.	Conclusiones y recomendaciones	223
9.1	Conclusiones	223
9.2	Recomendaciones	227
	Referencias	229

Figuras

Figura 1.1 Vigilancia de algas tóxicas y/o mariscos en aguas costeras de países europeos miembro del CIEM desde 1991 a 2000

Figura 1.2 Vigilancia de algas tóxicas y/o mariscos en aguas costeras de países norteamericanos miembro del CIEM desde 1991 a 2000

Figura 2.1 Estructuras químicas de las toxinas PSP

Figura 2.2 Presencia de toxinas PSP en aguas costeras de países europeos miembro del CIEM desde 1991 a 2000

Figura 2.3 Presencia de toxinas PSP en aguas costeras de países europeos miembro del CIEM desde 1991 a 2000

Figura 3.1 Estructuras químicas del ácido ocadaico, dinofisistoxinas y pectenotoxinas

Figura 3.2 Estructuras químicas de yesotoxinas y adriatoxina

Figura 3.3 Presencia de toxinas DSP en aguas costeras de países europeos miembro del CIEM desde 1991 a 2000

Figura 3.4 Presencia de toxinas DSP en aguas costeras de países norteamericanos miembro del CIEM desde 1991 a 2000

Figura 4.1 Estructuras químicas del ácido domoico y sus isómeros

Figura 4.2 Presencia de toxinas ASP en aguas costeras de países europeos miembro del CIEM desde 1991 a 2000

Figura 4.3 Presencia de toxinas ASP en aguas costeras de países norteamericanos miembro del CIEM desde 1991 a 2000

Figura 5.1 Estructuras químicas de las brevetoxinas de tipo A y B

Figura 5.2 Estructuras químicas de los análogos de las brevetoxinas BTX-B1, -B2 y -B4 aisladas de mariscos contaminados

Figura 5.3 Estructura química del análogo de la brevetoxina BTX-B3 aislado de mariscos contaminados

Figura 5.4 Toxina ictiotóxica fosforada aislada del *G. breve*

Figura 5.5 Presencia de toxinas DSP en aguas costeras de países norteamericanos miembro del CIEM desde 1991 a 2000

Figura 6.1 Estructuras químicas de las azaspirácidas

Figura 6.2 Presencia de toxinas ASP en aguas costeras de países europeos miembro del CIEM desde 1991 a 2000

Figura 7.1 Estructura de las ciguatoxinas (CTXs) del Pacífico (P) y del Caribe (C)

Figura 7.2 Presencia de toxinas DSP en aguas costeras de países norteamericanos miembro del CIEM desde 1991 a 2000

Cuadros

Cuadro 2.1 Mariscos con toxinas PSP

Cuadro 2.2 Toxicidad aguda de la STX en ratones

Cuadro 2.3 DL50 oral de la STX en otras especies

Cuadro 2.4 Toxicidad relativa de las PSP en el bioensayo en ratón

Cuadro 3.1 Toxicidad aguda (dosis letal) de la administración intraperitoneal de las DSP en ratones

Cuadro 5.1 Toxicidad aguda de las brevetoxinas en ratones suizos

Cuadro 5.2 Toxicidad intraperitoneal aguda de análogos de la brevetoxina en ratones

Cuadro 6.1 Distribución de las toxinas AZP en tejidos de mejillones

Cuadro 6.2 Niveles de AZAs en mejillones y ostras de Irlanda

Cuadro 7.1 Ejemplos de peces asociados con la ciguatera

Cuadro 7.2 Efectos de las ciguatoxinas (CTXs), gambiertoxinas (GTXs) y maitotoxinas (MTXs) administradas intraperitonealmente (i.p.) a ratones de (18-)20 g

Agradecimientos

Este trabajo fue elaborado en el marco del proyecto “Toxinas Naturales” (Proyecto RIVM 310301), implementado por el Instituto Nacional de Salud Pública y el Medio Ambiente, de los Países Bajos, en nombre de la Autoridad de Alimentos y de Seguridad de los Productos del Consumidor, Países Bajos.

La FAO expresa su agradecimiento a los autores H.P. Van Egmond, M.E. Van Apeldoorn y G.J.A. Speijers del Instituto Nacional de Salud Pública y el Medio Ambiente de los Países Bajos, por su valioso trabajo. Se agradecen las contribuciones de G. Van de Werken (Instituto Nacional de Salud Pública y el Medio Ambiente) y R.W. Stephany (Universidad de Utrecht e Instituto Nacional de Salud Pública y el Medio Ambiente). Un especial agradecimiento para D.G. Groothuis (Autoridad de Alimentos y de Seguridad de los Productos del Consumidor) por facilitar y apoyar de manera continúa las actividades resultantes en este trabajo. Se agradece, asimismo, a C. Bélin, Ifremer (Nantes, Francia) por proporcionar mapas de monitoreo de las algas tóxicas y de la presencia de biotoxinas marinas en las aguas costeras de los países miembro del Consejo Internacional para la Exploración del Mar (CIEM). Finalmente la FAO agradece a todos los países que contribuyeron con este trabajo recogiendo y proporcionando valiosos datos e informaciones.

Prólogo

La FAO publica este Estudio de Alimentación y Nutrición sobre Biotoxinas Marinas como un esfuerzo para apoyar el intercambio de informaciones científicas en un tema importante para la inocuidad alimentaria a nivel mundial. Las biotoxinas marinas representan una amenaza importante y creciente para la salud humana en muchas zonas del mundo. El impacto se manifiesta como intoxicaciones en los seres humanos que incluso pueden conducir a la muerte, en mortandades masivas de mariscos o pescados y en la muerte de animales y aves marinos por ingerir mariscos o pescados contaminados.

Se ofrece una extensa revisión de diferentes aspectos vinculados con cinco síndromes de intoxicación por mariscos (intoxicación paralítica por mariscos, intoxicación diarreica por mariscos, intoxicación amnésica por mariscos, intoxicación neurológica por mariscos, intoxicación azaspirácida por mariscos), además del síndrome de intoxicación por pescado (intoxicación por ciguatera). Se discuten en detalle diversos aspectos de estos síndromes, incluso las toxinas responsables producidas por organismos marinos, las estructuras químicas y los métodos analíticos empleados para las toxinas, la presencia y el hábitat de los organismos productores de toxinas, estudios de caso y los reglamentos vigentes. Basado en este análisis, se hace una evaluación de riesgos para cada una de las diferentes toxinas y se elaboran recomendaciones para una mejor gestión de riesgos que permita reducir los efectos nocivos de estas toxinas en la salud pública.

Este estudio destaca las dificultades de una evaluación de riesgos basada en criterios científicos por la falta de datos toxicológicos y de exposición a diferentes toxinas marinas. Los niveles de tolerancia válidos actualmente para las ficotoxinas generalmente se basan en datos de casos de intoxicación en seres humanos. Sin embargo, esta información es pocas veces precisa y completa, habitualmente restringida a toxicidad aguda. En consecuencia, debe prestarse creciente atención a extender y mejorar futuras iniciativas para el seguimiento, la detección y el intercambio de opiniones sobre las biotoxinas marinas de forma de reducir los riesgos a la salud pública asociados con el consumo de mariscos y pescados contaminados.

Abreviaturas

AOAC	Asociación de Químicos Analistas Oficiales
ASP	Intoxicación amnésica por mariscos
AZA	Azaspiracida
AZP	Intoxicación azaspiracida por mariscos
BTX	Análogos de las brevetoxinas, metabolitos formados en peces
CCF	Cromatografía en capa fina
C-CTX	Ciguatoxina caribeña
CE	Comisión Europea
CEN	Comité Europeo de Normalización
CFP	Intoxicación ciguatera por pescado
CG	Cromatografía de gases
CID (= CAD)	Disociación inducida por colisión (= descomposición activada por colisión)
CIEM	Consejo Internacional para la Exploración del Mar
CL	Cromatografía líquida
CL-DF	Cromatografía líquida con detector de fluorescencia
CL-EM	Cromatografía líquida con detector de espectrometría de masas
CL-ISP-EM	CL-EM de nebulización iónica
CL-UV	Cromatografía líquida con detector ultravioleta
CTX	Ciguatoxina
CZE	Electroforesis de zona capilar
DA	Acido domoico
DAP	Intoxicación por ácido domoico
DSP	Intoxicación diarreica por mariscos
DTX	Dinofisistoxina
ECA	Electroforésis capilar
EIE	Enzimo inmuno ensayo
ELISA	Ensayo Relacionado con Enzimas Inmuno Absorbente
EM	Espectrometría de masas
EM/EM	Espectrometría de masas en tandem
EM ⁿ	EM de tandem múltiple
ENSO	Oscilación Meridional de El Niño
ESI	Ionización por electronebulización (electrospray)
FAB	Bombardeo con átomos rápidos

FIA	Análisis por inyección de flujo
GNTX	Goniautoxina
GTX	Gambiertoquina
HILIC	Cromatografía líquida de interacción hidrofílica
HP	Hepatopáncreas
IAC	Columnas de inmuno afinidad
KB células	Línea celular humana derivada de un carcinoma epidermoide
LCR	Laboratorio Comunitario de Referencia
LD	Límite de detección
LNR	Laboratorios Nacionales de Referencia
LOAEL	Nivel mínimo con efecto adverso observable
MAB	Anticuerpos monoclonales
MEKC	Cromatografía electrocinética capilar micelar
MIA	Ensayo con inmunoesferas de membrana
MTX	Maitotoxina
N : P	Relación Nitrógeno:fósforo
NOAEL	Nivel sin efecto adverso observable
NSP	Intoxicación neurológica por mariscos
OA	Acido ocadaico
OCR	Oficina Comunitaria de Referencia
PbTx	Brevetoxina
pc	Peso corporal
P-CTX	Ciguatoxina del Pacifico
PSP	Intoxicación paralítica por mariscos
PTX	Pectenotoxina
PTX2SA	Acido pectenotoxina-2 seco
RIE	Radioinmunoensayo
RMN	Resonancia magnética nuclear
SAX-SPE	Extracción en fase sólida-Intercambio aniónico fuerte
SEC	Cromatografía de exclusión de tamaño
SIM (= SIR)	Seguimiento con ión selectivo
SIR (= SIM)	Registro con ión selectivo
SMT	Programa de Normas, Medidas y Ensayos
SPIA	Ensayo con inmunoesferas en fase sólida
SRM	Seguimiento selectivo de reacción (una técnica EM/EM similar a la SIM)

STX	Saxitoxina
STXOL	Saxitoxinol
TDI	Ingesta diaria tolerable
UV	Ultravioleta (Detección)
Activación de banda ancha	Un tipo de excitación de resonancia (en EM de captura iónica) en la que el voltaje RF se aplica a una ventana de masa sustancialmente más ancha que la ventana iónica padre.
YTX	Yesotoxina

1. Introducción

Las algas planctónicas microscópicas de los océanos del mundo resultan críticas para los mariscos bivalvos que se alimentan por filtración (ostras, mejillones, vieiras, almejas), así como para las larvas de crustáceos y peces con escamas comercialmente importantes. De las 5 000 especies de algas marinas existentes, aproximadamente 300 pueden a veces presentarse en cantidades tan elevadas (floraciones) que decoloran la superficie del mar, en las denominadas “mareas rojas” (Hallegraeff *et al.*, 1995; Lindahl, 1998). La palabra “floración” se emplea para indicar el crecimiento explosivo de cualquiera de estos organismos, cuyo color puede variar del rojo indicado comúnmente (las denominadas “mareas rojas”) a diferentes tonalidades de amarillo, verde, marrón o azul según el tipo de protista, su profundidades y concentración. La denominación corriente de “marea roja” resulta del hecho que a menudo cantidades masivas de organismos se presentan como franjas rojas sobre la superficie del agua (Bower *et al.*, 1981). No están aun totalmente aclaradas las condiciones para la floración de un alga, pero influyen probablemente sobre el fenómeno circunstancias climáticas e hidrográficas (Van Egmond y Speijers, 1999). Los crecimientos explosivos ocurren a veces al cambiar las condiciones climáticas, pero otras causales agregadas pueden ser variaciones en las corrientes verticales, la temperatura, transparencia, turbulencia o salinidad de las aguas, la concentración de nutrientes disueltos, los vientos o la iluminación superficial (Bower *et al.*, 1981).

No existen razones para suponer que las intoxicaciones con mariscos puedan predecirse a partir de las propiedades de la zona. Las mareas rojas a menudo ocurren cuando aparece una capa superficial estratificada sobre las aguas más frías y ricas en nutrientes como consecuencia del calentamiento o por desplazamientos de agua dulce. Las algas de crecimiento veloz agotan rápidamente los nutrientes en la capa superior, dejando sólo nitrógeno y fósforo por debajo de la superficie de éstas, en la denominada picnoclina. Las algas sin movilidad no acceden fácilmente a esta capa, pero las móviles, como los dinoflagelados, pueden reproducirse aceleradamente. Muchas nadan a velocidades superiores a los 10 metros diarios, y algunas migran verticalmente todos los días; de día habitan en la superficie, como tomando el sol y, por la noche descienden a la picnoclina para absorber nutrientes. Como resultado pueden súbitamente aparecer floraciones sobre las aguas superficiales, desprovistas de nutrientes, y en apariencia incapaces de sostener crecimientos tan prolíficos (Anderson, 1994).

Hay suficientes evidencias, de diferentes zonas, (como el puerto de Hong Kong, el Mar Interior de Seto en Japón y aguas costeras del norte de Europa) que la “eutroficación cultural” resultante de aguas domésticas, industriales y de desechos agrícolas puede estimular floraciones perjudiciales de algas. Es incluso posible, que especies de algas no habitualmente tóxicas, se conviertan en tales por exposición a regímenes con nutrientes atípicos (por ej. deficiencia de fosfatos) resultantes de una eutroficación cultural. Los cambios en los usos de la tierra, como la deforestación, pueden también causar cambios en la composición de las especies del fitoplancton, aumentando las concentraciones de sustancias húmicas en los desplazamientos de tierras. La precipitación ácida aumenta aun más la movilidad en los suelos de las sustancias húmicas y de los metales traza (Hallegraeff, 1993).

Algunas especies producen decoloraciones del agua básicamente inocuas. Otras especies, en cambio, pueden florecer tan densamente bajo condiciones excepcionales en bahías protegidas, que matan indiscriminadamente peces e invertebrados agotando el oxígeno. Otras especies de algas pueden ser perjudiciales para peces e invertebrados (especialmente en sistemas de acuicultura intensivos) dañando o tapando sus agallas. Hay, además unas 75, especies de micro algas capaces de producir poderosas toxinas (denominadas ficotoxinas) que se desplazan por la cadena alimentaria (moluscos, crustáceos y peces de escama) para ser consumidos finalmente por seres humanos, provocando diversas enfermedades gastrointestinales y neurológicas. Algunas especies de algas ya producen toxinas poco concentradas, de unos pocos cientos de células por litro, en tanto que otras deben contar con millones de células por litro, para resultar de alguna manera perjudiciales. La mayoría de las especies perjudiciales tiene patrones de distribución limitados, aunque algunas lo están por todo el mundo (Hallegraeff *et al.*, 1995; Lindahl, 1998).

No resulta claro porque producen toxinas algunas especies de microalgas. Las toxinas son metabolitos secundarios sin papel explícito en la economía interna de los organismos productores y con actividades muy específicas en mamíferos. Son probablemente utilizadas por los organismos productores como una forma de luchar por espacios, combatir la predación o como defensa contra un crecimiento desmesurado de otros organismos (Botana *et al.*, 1996).

Durante las dos últimas décadas, ha aumentado la frecuencia, intensidad y distribución geográfica de las floraciones de algas perjudiciales, así como la de los compuestos tóxicos presentes en la cadena alimentaria marina. Se han ofrecido diferentes explicaciones para esta tendencia, como una mayor concientización a nivel científico de las especies de algas tóxicas, una mayor utilización de las aguas costeras en acuicultura, la transferencia de mariscos de una zona a otra, la eutrofización cultural de aguas domésticas, industriales y de desechos agrícolas, mayor movilidad de las sustancias húmicas y metales traza desde el suelo por deforestación y/o precipitaciones ácidas (lluvia ácida), y condiciones climáticas poco comunes (Hallegraeff *et al.*, 1995). Además, se realiza actualmente la vigilancia de especies tóxicas de algas y/o mariscos y peces en diversas zonas costeras del mundo. Las Figuras 1.1 y 1.2 ilustran la vigilancia de las aguas costeras de países europeos y norteamericanos en el Consejo Internacional para la Exploración del Mar (CIEM).¹ Otra posible explicación de la creciente tendencia de aparición de floraciones de algas perjudiciales es el traslado de quistes en reposo de dinoflagelados, especialmente desde productores de toxina paralítica de mariscos (McMinn *et al.*, 1997), en las aguas de lastre de los barcos o por el movimiento de poblaciones de mariscos de una zona a otra (Hallegraeff *et al.*, 1995).

El quiste en reposo o hipnozigote es la forma inmóvil de algunos dinoflagelados. Estos quistes se hunden hasta el fondo del mar, acumulándose en el límite entre agua y sedimento donde invernan. Cuando vuelven a darse condiciones favorables de crecimiento, los quistes pueden germinar y volver a inocular el agua con células nadadoras que pueden florecer posteriormente. De esta manera se asegura la supervivencia de algunos dinoflagelados de una estación a la siguiente (Mons *et al.*, 1998).

Los cambios del agua de lastre de los barcos cargada en un puerto abierto, por agua de mar abierto en medio del océano, puede resultar parcialmente eficaz para controlar no sólo quistes sino dinoflagelados y diatomeas perjudiciales. La descarga incompleta del agua y sedimentos de los tanques de lastre durante la operación de recarga causa la eliminación incompleta de los organismos perjudiciales (Zhang y Dickman, 1999). Sin embargo, los cambios en mares regionales (por ejemplo el Mar del Norte, el Mar de Irlanda el Canal de la Mancha) son menos eficientes que los realizados con aguas oceánicas. Los cambios en aguas regionales pueden disminuir los riesgos de aguas contaminadas de puertos europeos, pero resultar en el traslado de especies de fitoplancton potencialmente peligrosas de estas zonas (Macdonald y Davidson, 1998)

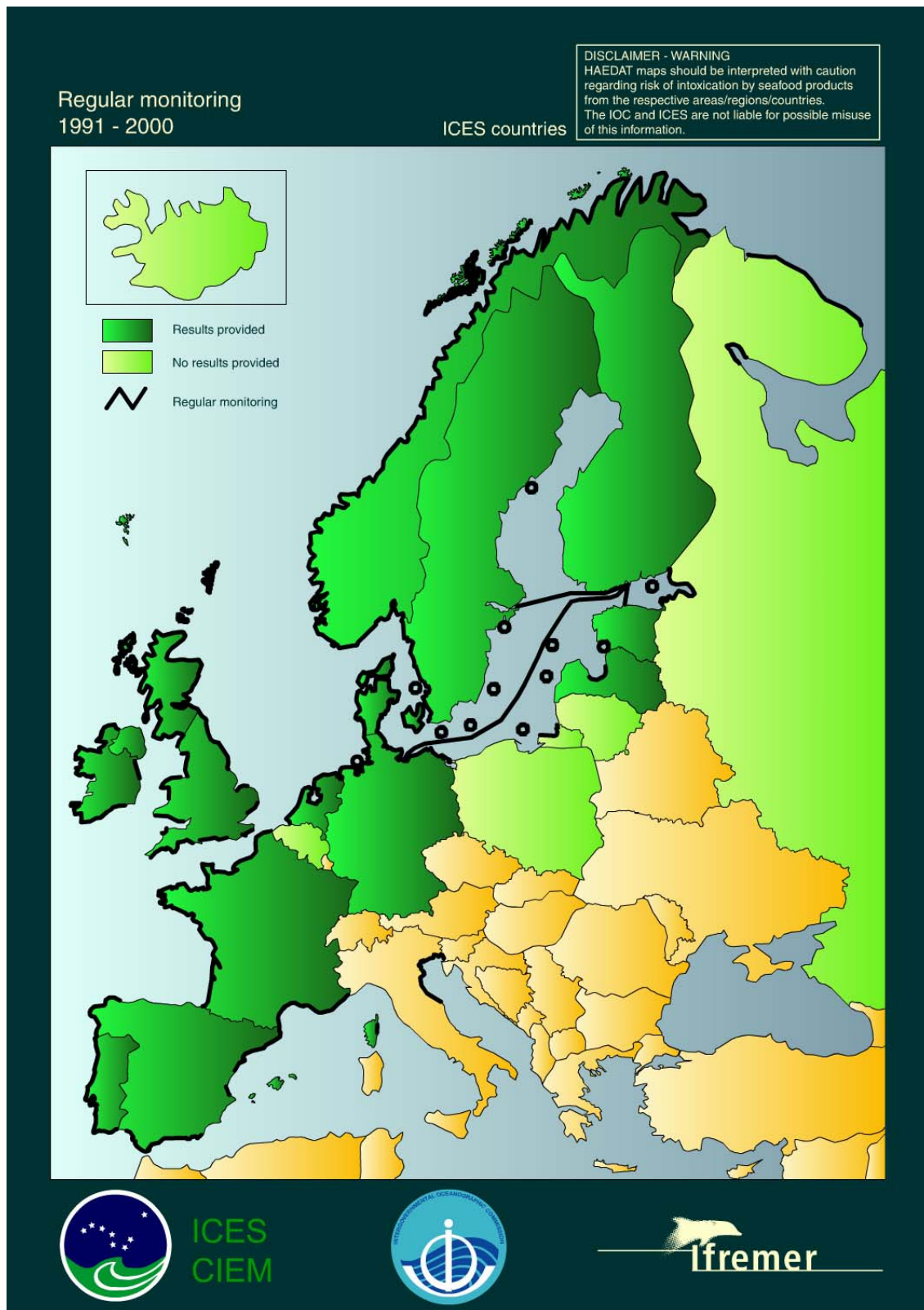
Las ficotoxinas marinas más importantes son las toxinas de mariscos y las ciguatoxinas. Hasta ahora, se distinguen cinco grupos de toxinas de mariscos, denominadas:

- i. toxinas paralíticas de mariscos, causantes de la intoxicación paralítica por mariscos (PSP);
- ii. toxinas de mariscos diarreicas, causantes de intoxicación diarreica por mariscos (DSP);
- iii. toxinas de mariscos amnésicas, causantes de intoxicación amnésica por mariscos (ASP);
- iv. toxinas de mariscos neurotóxicas, causantes de intoxicación neurotóxica por mariscos (NSP); y
- v. toxinas de mariscos azaspirácidas, causantes de intoxicación azaspirácida por mariscos (AZP) (Hallegraeff *et al.*, 1995; Lindahl, 1998).

Las ciguatoxinas causan intoxicación por ciguatera en pescados (CFP). Las PSP, DSP, ASP, NSP y AZP son causadas por seres humanos que consumen productos de mariscos contaminados, en tanto que la CFP es causada por el consumo de pescados marinos carnívoros tropicales y sub tropicales que han acumulado la toxina de la ciguatera a lo largo de la cadena alimentaria. En esta publicación se presentarán diversos aspectos de estas toxinas.

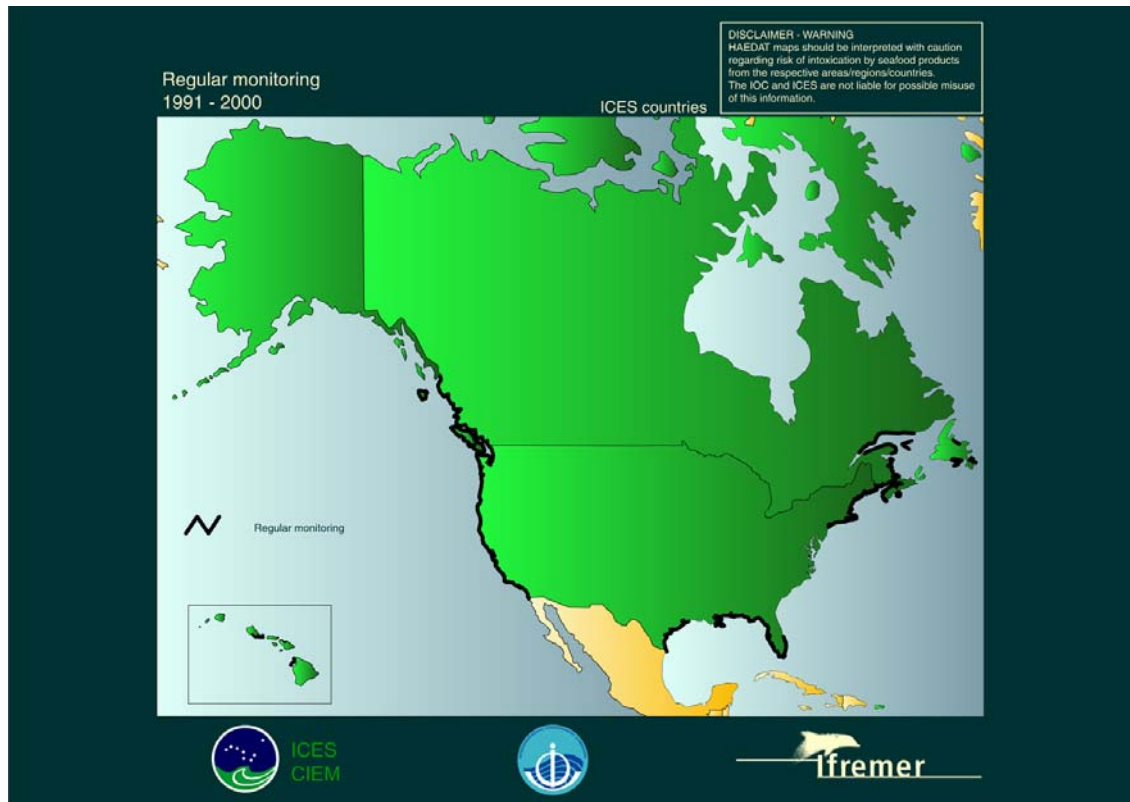
¹ Fuente: www.ifremer.fr/envlit/documentation/dossiers/ciem/aindex.htm

Figura 1.1 Vigilancia de algas tóxicas y/o mariscos en aguas costeras de países europeos miembro del CIEM desde 1991 a 2000



Fuente: www.ifremer.fr/envlit/documentation/dossiers/ciem/aindex.htm

Figura 1.2 Vigilancia de algas tóxicas y/o mariscos en aguas costeras de países norteamericanos miembro del CIEM desde 1991 a 2000



Fuente: www.ifremer.fr/envlit/documentation/dossiers/ciem/aindex.htm

2. Intoxicación Paralítica por Mariscos (PSP)

Las toxinas paralíticas (PSP) son compuestos que se acumulan en los mariscos que ingieren algas productoras de estas toxinas. La ingestión de estos mariscos contaminados por acumulación de toxinas causa, en el ser humano, la intoxicación paralítica por mariscos. Los síntomas de PSP pueden presentarse como un entumecimiento o picazón leve hasta la parálisis respiratoria completa, que en casos fatales, ocurre entre dos y doce horas después de la ingestión.

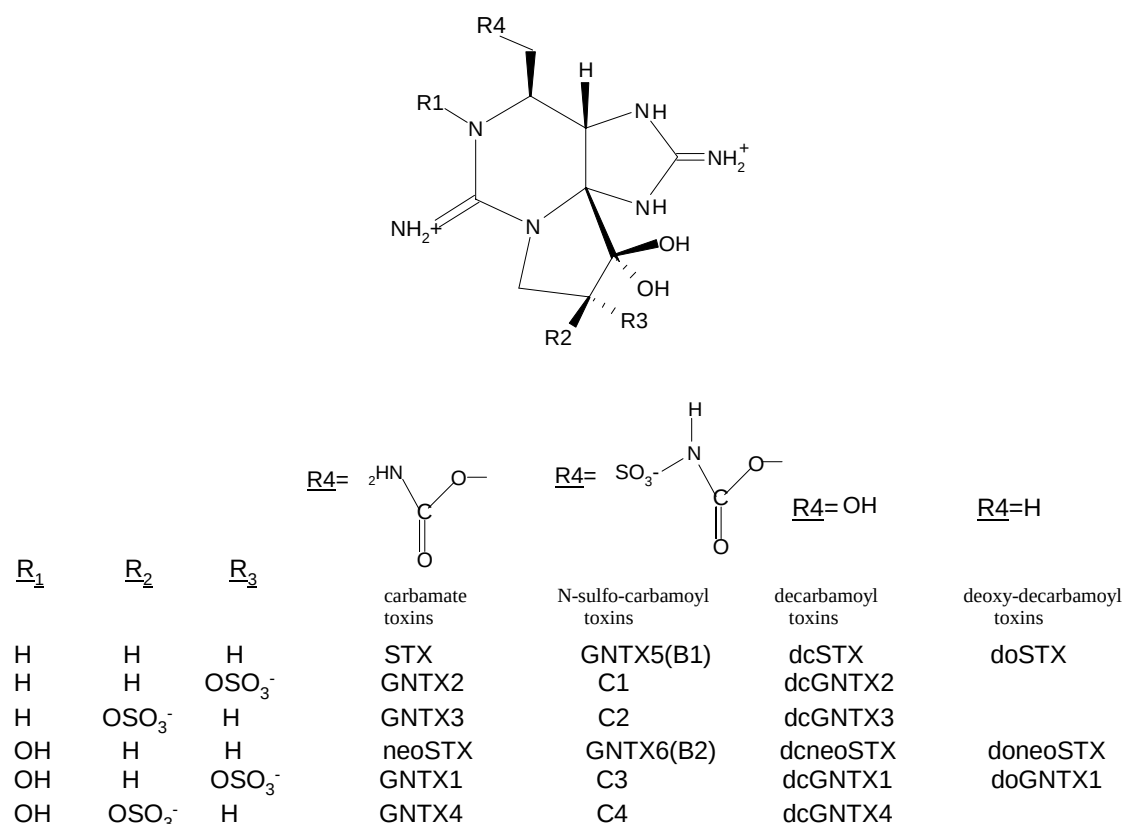
Las toxinas PSP son un grupo de 21 tetrahidropurinas estrechamente relacionadas (ver la Figura 2.1) cuya toxicidad difiere ampliamente. La más tóxica es la saxitoxina (STX), la primera toxina PSP caracterizada químicamente. Los dinoflagelados del género *Alexandrium* de zonas de clima tropical o templado son los principales responsables de la producción de estas toxinas. Los mariscos que se alimentan de estos dinoflagelados acumulan las toxinas, sin sufrir los efectos nocivos de las toxinas ya que son bastante resistentes. En los últimos 20 años se ha registrado un aumento aparente de las intoxicaciones causadas por PSP. Sin embargo, aún no se sabe a ciencia cierta si el aumento es real, si puede ser la consecuencia de los progresos en la identificación, detección y de registros médicos, o si se debe a una expansión del cultivo y del consumo de mariscos. Una veintena de países cuentan con reglamentación referente a las toxinas PSP, en la mayoría de los casos referida a las toxinas PSP como un grupo.

2.1 Estructuras químicas y propiedades

Las toxinas PSP constituyen un grupo de compuestos de la tetrahidropurina estrechamente relacionados, divididos en cuatro subgrupos: i) carbamato (STX, neoSTX y las gonyautoxinas (GNTX1-4); ii) N-sulfo-carbamoil (GNTX5-6, C1-4); iii) decarbamoil (dc-) (dcSTX, dcneoSTX, dcGNTX1-4); y iv) compuestos de desoxidecarbamoil (do-) (doSTX, doneoSTX y doGNTX1). Se han identificado al menos 21 toxinas PSP (ver la Figura 2.1), principalmente a partir de dinoflagelados y de mariscos que se alimentan de algas tóxicas. Los primeros intentos de aislar las toxinas PSP datan de hace más de un siglo, pero, como las toxinas se presentan como mezclas de compuestos con distintas capacidades de ionización, los progresos iniciales fueron muy lentos. La cromatografía de intercambio iónico, junto con el bioensayo en ratón, permitieron aislar una toxina hidrosoluble básica a partir de la almeja amarilla, *Saxidomus giganteus*, denominada, con el transcurso del tiempo saxitoxina (STX).

El primer derivado cristalino de la STX se sintetizó en 1975, y se estudió su estructura (Bower *et al.*, 1981). Esta se determinó mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) y cristalografía de rayos X (la Figura 2.1 ilustra la estructura química de la STX y de otras toxinas PSP). La actividad tóxica reside en el grupo cetona hidratado o dihidroxi del anillo heterocíclico de cinco miembros, actividad que desaparece cuando estos grupos se transforman en monohidroxi por reducción catalítica con hidrógeno. La sustitución de la cadena secundaria con el grupo carbamoil en el anillo heterocíclico de seis miembros por un grupo hidroxilo resulta en una molécula con aproximadamente el 60 por ciento de la actividad tóxica original. Este grupo hidroxilo activo permite preparar distintos derivados de la STX (Mons *et al.*, 1998). Las toxinas PSP son termoestables en pH ácido (salvo los componentes del N-sulfo-carbamoil), pero inestables en condiciones alcalinas, oxidándose fácilmente (Mons *et al.*, 1998).

Figura 2.1 Estructuras químicas de las toxinas PSP



Fuente: Mons *et al.*, 1998; Quilliam *et al.*, 2001

2.2 Métodos de análisis

2.2.1 En general

Las toxinas PSP en los mariscos constituyen un peligro potencial, tanto para el ser humano como para los animales, por lo que es necesario contar con un método rápido, sensible y específico para determinar su presencia. El bioensayo en ratón es el método tradicionalmente utilizado para determinar la presencia de toxinas PSP en mariscos. Sin embargo, la polémica en torno a la utilización de mamíferos en ensayos, sumada a los problemas y limitaciones inherentes a su realización, han impulsado el desarrollo de otros métodos, que incluyen ensayos farmacológicos, inmunoensayos, ensayos químicos o de separación, y bioensayos alternativos (Mons *et al.*, 1998).

2.2.2 Bioensayos

ensayos in vivo

bioensayo en ratón

En la actualidad, la mayoría de los programas de control de la toxicidad en mariscos aún utilizan el bioensayo en ratón. El procedimiento fue desarrollado hace más de 50 años. La Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) lo refinó y normalizó para contar con un método rápido y relativamente preciso para medir el contenido de toxinas PSP totales (Hollingworth y Wekell, 1990). El procedimiento consiste en inyectar 1 ml de extracto ácido del marisco a ratones de 20 gramos y registrar el tiempo transcurrido hasta la muerte del animal. Si se trata de extractos muy tóxicos, se diluyen de forma de asegurar que la muerte ocurra en un período de entre cinco y 15 minutos. La

toxicidad de la muestra se expresa en unidades ratón (UR) y se calcula según las curvas de respuesta a las dosis obtenidas con estándares de STX. Una unidad ratón es la cantidad de toxina inyectada que causa la muerte de un ratón de 20 g en 15 minutos, equivalente a 0,18 µg de STX. En la mayoría de los países, las pesquerías se cierran si las concentraciones alcanzan 400 UR/100 g de marisco. El límite de detección del ensayo es aproximadamente 40 µg de STX/100 g de tejido de marisco, con una precisión de ± 15 -20 por ciento. Al respecto, se determinó que un elevado contenido de sal en la muestra produce interferencias al inhibir los efectos tóxicos (Schantz *et al.*, 1958). La acumulación de zinc en las ostras causa la muerte en ratones en concentraciones que no constituyen una amenaza para la salud humana (Aune *et al.*, 1998). Los resultados de extractos muy tóxicos son sumamente variables (Park *et al.*, 1986). Las dificultades prácticas que presenta este método son:

- es necesario contar con una colonia de ratones de entre 19 y 22 g de peso y puede ocurrir que no se disponga de suficientes ratones en épocas de control intensivo;
- el límite de detección del ensayo varía según la cepa;
- la relación entre el tiempo hasta la muerte y la concentración de toxinas no es lineal;
- la determinación exacta del tiempo hasta la muerte es muy trabajosa; y
- conlleva el sacrificio de un gran número de animales.

A pesar de las dificultades mencionadas, el ensayo se ha utilizado con un amplio espectro de moluscos y crustáceos, y continúa siendo el método oficial en la mayoría de los países que cuentan con reglamentación para las toxinas PSP en productos marinos.

En Francia, LeDoux y Hall (2000) realizaron un estudio de aptitud con ocho laboratorios que utilizaban el ensayo en ratones, con el fin de analizar muestras de ostras contaminadas con toxinas PSP en concentraciones no detectables, de 153 y de 335 µg de STX/100 g de carne. Los autores concluyeron que, en términos del desempeño general, los ocho laboratorios participantes cumplían con los requisitos de aptitud para la realización del ensayo en ratones de la AOAC. Las variaciones dentro de cada laboratorio y entre los laboratorios fueron entre 5 y 10 y entre 8 y 40 por ciento, respectivamente. En muestras enriquecidas, los autores observaron una recuperación baja, lo que apunta a una subestimación de los “efectos de la sal”. Esta falta de precisión obligaría a establecer un margen de seguridad adecuado para proteger a los consumidores

Earnshaw (2003) indica que FAPAS® (Food Analysis Performance Assessment Scheme) organizó un estudio piloto de detección de toxinas PSP por bioensayo con ratones en mejillones liofilizados. Nueve de los 15 laboratorios que participaron en el estudio utilizaron el bioensayo en ratón. Los materiales del estudio se prepararon a partir de materiales de referencia certificados (Van Egmond *et al.*, 1998), a fin de obtener una estabilidad y homogeneidad satisfactorias. Los resultados obtenidos, sin embargo, presentaron una gran variación: entre 1 y 383 µg/100 g (expresados como toxinas PSP totales en base al peso en fresco), con una mediana de 137 µg/100 g. Esta variación no permitió evaluarlos estadísticamente.

ensayos in vitro

ensayo con cortes de hipocampo

Kerr *et al.* (1999) investigaron la utilización de preparaciones *in vitro* de cortes de hipocampo de rata como una forma de detectar, rápida y específicamente, la presencia de toxinas de algas marinas, a saber, STX, brevetoxina y ácido domoico, en tejido de mariscos o de pez de aleta. Los autores identificaron las propiedades electro-fisiológicas específicas de cada toxina y concluyeron que las preparaciones de cortes de hipocampo son útiles para detectar y analizar las biotoxinas marinas en tejido de mariscos contaminados.

ensayo de bloqueo del canal de sodio

Algunos autores proponen, como método de ensayo alternativo, estudiar el mecanismo mediante el cual las neurotoxinas PSP alteran el funcionamiento celular. Las toxinas se unen a los canales de sodio de las membranas de las células nerviosas, alterando la despolarización normal. La toxicidad es

proporcional a la cantidad de toxina unida. Davio y Fontelo (1984) midieron la cantidad de STX radiomarcada que se desplaza en una preparación de cerebro de rata. Kogure *et al.* (1988) y Gallacher y Birkbeck (comunicación personal; Van Egmond *et al.*, 1993) proponen exponer las células de neuroblastoma de ratón a la veratridina. Los autores observaron que las células se hinchan y finalmente se lisan y, que la adición de ouabaina junto con veratridina, aumenta la entrada del ión sodio. La STX, al bloquear los canales de sodio, inhibe la actividad de estos dos compuestos; morfológicamente las células no presentan cambios. La fracción de células no afectadas por la ouabaina y la veratridina es directamente proporcional a la concentración de STX y de sus análogos.

Jellett *et al.* (1992) modificaron el bioensayo para mejorar su rapidez y utilidad, eliminando la necesidad de contar las células individuales para determinar los equivalentes de STX. Los autores utilizaron, en cambio, un lector de microplacas para determinar automáticamente la absorción de cristal violeta en células de neuroblastoma teñidas. Una vez incluida esta y otras modificaciones técnicas de menor importancia, los autores probaron sistemáticamente el bioensayo en cultivo de tejidos y observaron que el límite de detección inferior es 10 ng eq de STX por ml de extracto (= 2,0 µg eq de STX/100 g de tejido de marisco). Luego compararon esta versión del bioensayo en cultivo de tejidos con el bioensayo en ratón estándar, utilizando 10 extractos ácidos de dinoflagelados (*Alexandrium excavata* y *Alexandrium fundyense*) y 47 extractos de tejido de marisco preparados según el procedimiento de la AOAC. Los resultados del bioensayo en cultivo tisular fueron prácticamente idénticos a los del bioensayo en ratón ($r > 0,96$) y los autores observaron que el primero es bastante más sensible que el segundo. Por otro lado, analizaron 12 extractos por CL y observaron que estos resultados son menos uniformes que los obtenidos con los dos bioensayos. Truman y Lake (1996) también compararon los resultados del ensayo en cultivo de células de neuroblastoma y los del bioensayo en ratón. De los extractos de marisco analizados, 29 dieron resultados negativos en ambos ensayos, mientras que 57 dieron resultados positivos en al menos un ensayo. Los estudios realizados con muestras enriquecidas de extractos de marisco muestran que en el ensayo con neuroblastomas, la respuesta a la adición de STX es buena. La correlación entre los ensayos para equivalentes de STX en mariscos fue de 0,876. Los autores concluyeron que, si bien los resultados obtenidos permiten utilizar el ensayo con neuroblastomas como un procedimiento de selección, es conveniente confirmar todo resultado próximo a los límites reglamentarios con el bioensayo en ratón.

En principio, el ensayo con células de neuroblastoma para detectar toxinas PSP en mariscos parece ser una alternativa viable al bioensayo en ratones. Sin embargo, los resultados de un estudio conjunto realizado en 1999 por la AOAC Internacional en el que se probó el procedimiento de Jellett *et al.* (1992), no fueron satisfactorios. El Comité de Métodos para Toxinas Naturales de la AOAC Internacional decidió discontinuar el método en estudio en la etapa de evaluación del procedimiento, debido a problemas prácticos de realización del ensayo y a problemas con el envío de los materiales de estudio (Información personal).

Shimojo e Iwaoka (2000) proponen detectar toxinas marinas específicas del canal de sodio, como por ejemplo la saxitoxina, mediante un ensayo por hemólisis. El método utiliza los principios del ensayo en cultivo de neuroblastomas de ratón para biotoxinas específicas del canal de sodio con glóbulos rojos de la tilapia, *Sarotherodon mossambicus*. Tanto la veratridina como la ouabaina reaccionan con los glóbulos rojos de la tilapia, alterando la permeabilidad de la membrana celular. La saxitoxina puede inhibir esta alteración (dejando a la célula normal del punto de vista morfológico). La detección de toxinas PSP se realiza secuenciando la adición de veratridina y de ouabaina, ya sea con la saxitoxina o con las muestras postextracción, a los glóbulos rojos. Según los autores, el ensayo permite detectar concentraciones de saxitoxina de 0,3 µg/ml, es decir apenas superiores al límite de detección del bioensayo en ratón; aunque no proporcionaron información alguna sobre su utilidad práctica en el análisis selectivo de mariscos.

Tanto el bioensayo en ratones como el bioensayo en cultivo tisular miden la toxicidad total, pero no el contenido de toxinas individuales.

Cheun *et al.* (1998) desarrollaron un sistema biosensor de tejidos consistente en un electrodo de Na⁺ recubierto con una membrana de vejiga de sapo integrado a una célula de flujo. En ausencia de bloqueadores del canal de Na⁺, los autores observaron el transporte activo del ion Na⁺, desde el interior de la membrana de vejiga de sapo hacia el exterior. Los autores escogieron un grupo de toxinas PSP, a saber, GNTX1, 2, 3 y 4, y registraron la respuesta del tejido sensor para cada una de ellas. En cuanto al grado de inhibición del rendimiento del sensor observaron que fue mayor con GNTX4, seguida de la GNTX3, GNTX1 y GNTX2 en orden decreciente. Salvo para el caso de la GNTX2, estos resultados concuerdan con los del bioensayo en ratón estándar.

Los resultados obtenidos para neoSTX y dcSTX con el sistema biosensor de tejidos concuerdan con los del bioensayo en ratón estándar (dentro de 5 µg de toxina/g de tejido húmedo).

Lee *et al.* (2000) utilizaron el sistema biosensor de tejidos para estudiar la toxicidad de cultivos de cepas de *Alexandrium tamarensis* en distintas condiciones ambientales. Los autores concluyeron que el método permite medir cantidades muy pequeñas (de 5 fg) de toxinas PSP en una célula de plancton individual y que es conveniente medir al menos 100 células para aumentar la sensibilidad del sistema. A título comparativo, cabe mencionar que para medir la producción de toxinas por CL es necesario recolectar al menos 6 000 células.

2.2.3 Bioensayos alternativos

La polémica en torno de la utilización de mamíferos en bioensayos continúa en aumento. Por este motivo se investiga la utilización de ensayos similares con invertebrados, como por ejemplo embriones de ostra o larvas de peces. En varios países europeos se utiliza el recuento de algas que se presumen tóxicas en el agua de mar como técnica de vigilancia (Hald *et al.*, 1991). Esta técnica, que podría clasificarse como un ensayo cualitativo, permite reducir el número de ensayos en ratones pero no es aplicable al control de calidad de mariscos para comercialización.

2.2.4 Ensayos bioquímicos

inmunoensayos

Ensayos ELISA

La popularidad de las pruebas de inmunoabsorción enzimática (ELISA) indirectas, con palitos de inmersión aumenta. Estas pruebas se utilizan para detectar una amplia gama de compuestos en función de la interacción entre un antígeno y un anticuerpo. Chu y Fan (1985) describen un sistema de ensayo para toxinas PSP con un antígeno de STX, preparado inyectando albúmina sérica de bovino a conejos. Los anticuerpos que genera el conejo se recogen y se liofilizan. En el sistema de ensayo, los antígenos se colocan en placas de microtitulación, estándares de STX o extractos de mejillón y se agregan diluciones de anticuerpos adecuadas. La cantidad de anticuerpo ligado se determina con un conjugado de peroxidasa IgG de cabra anticonejo y la cuantificación se realiza por medio de un ensayo colorimétrico con el sustrato. La STX del extracto de mejillón compite para ligarse al antígeno de STX que recubre la placa de microtitulación. Hasta hace poco tiempo, solo se disponía comercialmente de pruebas ELISA para la STX, que no son completamente específicas para la STX e inducen un cierto porcentaje de reacción con la decarbamoil-STX (dcSTX) y la neoSTX. Cembella y Lamoreux (1991) describen una prueba policlonal que cuantifica las STX, neoSTX, GNTX1 y GNTX3 y, si bien aún no han finalizado las evaluaciones, parece ser más sensible que la CL y más específica que el bioensayo en ratón.

Chu *et al.* (1996) compararon tres pruebas ELISA competitivas directas para el análisis de un gran número de mariscos contaminados. Los autores concluyeron que los resultados de las ELISA concuerdan muy bien con los del ensayo en ratón. Usleber *et al.* (1997) también concluyeron que, para el análisis de vieiras, los resultados de las pruebas ELISA guardan una buena correlación con los del ensayo en ratón. Kasuga *et al.* (1996), por el contrario, sostienen que, para analizar muestras de mariscos costeros, las pruebas ELISA no pueden reemplazar al ensayo con ratones debido a la

existencia de reacciones cruzadas impredecibles y a la subestimación de la toxicidad registrada en algunas muestras de mariscos contaminados provenientes del mar cercano a Japón.

Garthwaite *et al.* (2001) trabajaron en un sistema de selección de muestras de mariscos sospechosas, utilizando pruebas ELISA integradas para detectar las ASP, NSP, PSP y DSP (incluida la yesotoxina). Las muestras consideradas sospechosas se analizan mediante métodos aprobados por las autoridades reglamentarias internacionales. Los autores determinaron que la extracción con alcohol da una buena recuperación para todos los grupos de toxinas.

Kawatsu *et al.* (2002) desarrollaron un inmunoensayo de enzimas competitivas directas con un anticuerpo monoclonal específico para las gonyautoxinas 2/3 (GNTX2/3) y un conjugado de peroxidasa de rábano picante-saxitoxina. Los resultados mostraron que este inmunoensayo permite detectar concentraciones de GNTX2/3, dc-GNTX2/3, C1/2, GNTX1/4, STX y neoSTX inferiores al límite reglamentario de 80 µg/100 de tejido de marisco.

Varios artículos publicados recientemente tratan de la utilización de ensayos ELISA para analizar las toxinas PSP en mariscos. Las reacciones cruzadas con especificidades de unión más bajas y la falta de respuesta potencial a otras toxinas del grupo PSP, diferentes de la STX, son factores que limitan la aplicación práctica de estas pruebas; salvo que estudios formales y conjuntos, realizados conforme a procedimientos aprobados por la AOAC Internacional o por la ISO, demuestren que cuentan con características de desempeño aceptables. Tales estudios aún no se han publicado.

2.2.5 Análisis químicos

técnicas fluorométricas y colorimétricas

La oxidación alcalina de las toxinas PSP produce compuestos fluorescentes que se prestan a una determinación simple con técnicas fluorométricas (Bates y Rapoport, 1975; Bates *et al.*, 1978). Sin embargo, existen varios factores que afectan la uniformidad de los resultados obtenidos con estas técnicas. Para evitar la variabilidad de los resultados, es necesario controlar algunos factores, como por ejemplo: el pH durante la extracción y antes de la oxidación, la limpieza de la columna de intercambio iónico para eliminar los coextractantes que pudieran interferir y ciertos metales que pueden afectar la oxidación y la fluorescencia de los compuestos resultantes. También es necesario tener en cuenta que no todas las toxinas tienen la misma fluorescencia; por ejemplo la de muchas toxinas carbamato es muy débil. Una técnica que permite sortear este tipo de dificultades es someter las mismas muestras a ensayos colorimétricos. En cuanto a la sensibilidad de estas técnicas, se demostró que la técnica por fluorescencia es un orden de magnitud más sensible y la colorimétrica es apenas más sensible que el bioensayo en ratón (Mosley *et al.*, 1985)

Hungerford *et al.* (1991) automatizaron un método de fluorescencia utilizando el análisis por inyección de flujo. Este método permite realizar la corrección automática de la fluorescencia de fondo y clasificar rápidamente las muestras de mariscos según contengan o no toxinas PSP.

técnicas cromatográficas

La cromatografía líquida (CL) es la técnica de determinación de compuestos PSP más utilizada, además del bioensayo. En los últimos diez años la comunidad científica se abocó al desarrollo de un método de CL automático que permita analizar rutinariamente toxinas PSP. En general, los ensayos parten de la separación de las toxinas por cromatografía de intercambio iónico, utilizando un reactor postcolumna que oxida el efluente para producir derivados fácilmente detectables. La metodología propuesta por la Administración para el Control de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos separa 12 toxinas PSP carbamato y sulfocarbamato (Sullivan, 1988). La metodología está validada con el bioensayo en ratón con resultados generalmente satisfactorios y buena correlación ($r > 0,9$) (Sullivan, 1988). Los límites de detección son, en general, un orden de magnitud inferior a los del ensayo en ratones. En la práctica, el método de Sullivan (1988) ha presentado dificultades a la hora de

separar la STX de la dcSTX (Van Egmond *et al.*, 1994), motivo por el cual la mayoría de los laboratorios europeos que realizan análisis de PSP lo dejaron de utilizar.

Si bien la CL es una técnica útil, requiere de bastante destreza y necesita mucho tiempo para que el sistema funcione rutinariamente. La técnica tampoco es infalible. Thielert *et al.* (1991) demostraron que el método de Sullivan (1988) no es apto para separar las toxinas 6-decarbamoil, aunque lograron mejorar la resolución utilizando el análisis secuencial de las muestras con distintos sistemas de agentes tampón y reactivos de par iónico. Ledoux *et al.* (1991) describen los problemas que presenta la distinción de las toxinas del grupo C a partir del material fluorescente en mejillones no tóxicos. Waldock *et al.* (1991) concluyeron que la técnica de CL no es lo suficientemente rápida ni sólida para procesar el gran número de muestras generadas durante una floración.

Otro de los problemas que presenta la cromatografía es la separación de los picos debido al gran volumen de las mangueras de reacción postcolumna. Lawrence y Menard (1991) y Lawrence *et al.* (1991a) proponen solucionar el problema preparando derivados fluorescentes antes de separarlas por CL. Pero, por el momento, no se ha logrado separar todas las toxinas PSP conocidas utilizando este método ya que los productos de oxidación de algunas de ellas (por ejemplo GNTX2 y GNTX3) son idénticos.

Además, las diferencias en la química de cada toxina resultan en diferentes tasas de oxidación en el reactor postcolumna para cada compuesto. Estas diferencias obligan a calibrar continuamente el sistema con estándares de toxinas PSP a fin de realizar determinaciones lo suficientemente precisas. Hasta hace poco, solo se disponía comercialmente de un estándar de STX y era imposible estimar con precisión la cantidad de las otras toxinas PSP presentes en la mezcla. Los estándares certificados de STX, neoSTX, GNTX 1-4, GNTX 2/3 y GNTX 5 están disponibles comercialmente desde 2003 (Laycock *et al.*, 1994; NRC, 2003), lo que ha mejorado considerablemente la calidad de los resultados obtenidos por CL (Wright, 1995). El cambio de estándares requiere de especial cuidado, ya que se ha observado discontinuidad de los resultados obtenidos y diferencias de concentración de hasta un 20 por ciento entre las concentraciones de STX de los distintos proveedores (Quilliam *et al.*, 1999).

Earnshaw (2003) describe un estudio piloto sobre toxinas PSP en mejillones liofilizados, organizado en 2003 por el FAPAS[®] (Food Analysis Performance Assessment Scheme) con distintos métodos de CL (además del bioensayo en ratón, ver la Sección 2.2.2). Siete de los 15 laboratorios que participaron en el estudio utilizaron CL. Casi todos los laboratorios analizaron los materiales de ensayo para detectar la presencia de STX y dcSTX. Algunos también determinaron neoSTX, GNTX1/4, GNTX2/3, GNTX5, GNTX6, C1/2 y de C3/4. Los resultados obtenidos fueron desde no detectable hasta 83 µg/100 g (en base al peso en fresco) para STX, y entre 25 y 130 µg/100 g para dcSTX. El material de ensayo contenía < 3,5 µg de STX/100 g y ~ 80 µg de dcSTX/100 g. Al examinar los procedimientos analíticos se observó que todos aquellos laboratorios que detectaron valores positivos de STX utilizaron extracción con HC1 y ebullición (al igual que en el ensayo en ratones según el procedimiento de la AOAC) (Hollingworth y Wekell, 1990). Por el contrario, los laboratorios que utilizaron ácido acético sin ebullición en la extracción, no encontraron o casi no encontraron saxitoxina. La explicación está en la extracción con HC1 y ebullición que causa la hidrólisis parcial de algunas toxinas PSP, resultando en la conversión de algunas de ellas en análogos más tóxicos (por ejemplo la GNTX5 se convierte en STX). La extracción con ácido acético sin ebullición es un procedimiento más suave que deja el perfil de toxinas de la muestra prácticamente intacto. La muestra utilizada en el estudio de FAPAS no contenía STX pero si GNTX5. Este problema puede resolverse tomando conciencia y normalizando la metodología, medidas que incluso reducirían la variabilidad de los resultados analíticos, tal como demostró el estudio de aptitud holandés (Van Egmond *et al.*, 2004).

Entre 1993 y 1997 se llevó a cabo un proyecto para desarrollar materiales de referencia de mariscos con fracciones de masa certificadas de algunas toxinas PSP en el marco del Programa de Normalización, Medidas y Ensayos (antes llamado y también conocido como Oficina Comunitaria de Referencia) de la Comisión Europea. El trabajo se realizó con 13 laboratorios públicos y seis

universidades, que representaban los cinco mayores países productores de mariscos de la Unión Europea (UE) y algunos otros países miembro de la UE interesados en la determinación de toxinas PSP en mariscos. Otro estudio interlaboratorial realizado en la UE ya había demostrado que existía una base para desarrollar materiales de referencia (Van Egmond *et al.*, 1994).

El programa de investigación incluyó:

- estudios para mejorar y evaluar la metodología química;
- la identificación y determinación de la pureza de los estándares de PSP y su estabilidad en una solución;
- dos estudios de comparación de métodos analíticos;
- la preparación de materiales de referencia con estudios de estabilidad y homogeneidad; y
- un procedimiento de certificación.

En un principio, se solicitó a los laboratorios que efectuaran los análisis de soluciones de extractos de marisco con PSP y STX utilizando el método de su elección; pero, en el diseño final del estudio de certificación, solo se incluyeron los métodos por CL con derivatización pre y postcolumna. El proyecto concluyó con un informe que describe la certificación de las fracciones de masa de la STX y de la dcSTX en dos materiales de referencia de mejillón (BCR-CRMs 542 y 543). Incluye también la identificación de otras toxinas PSP y el procedimiento utilizado con una solución de enriquecimiento (CRM 663) con STX de concentración másica certificada (Van Egmond *et al.*, 1998; Van den Top *et al.*, 2000, 2001).

El Comité Europeo de Normalización seleccionó dos de los métodos utilizados en el proyecto del Programa de Normalización, Medidas y Ensayos que mostraron buenas características de desempeño (Lawrence y Menard, 1991; Franco y Fernandez, 1993) para redactar una norma. A la fecha, el método de Franco está en la etapa de Pre Norma Europea (CEN, 2002a) y el de Lawrence como Proyecto de Norma Europea (CEN, 2002b). Este último se utilizó con éxito en un estudio de aptitud sobre PSP en mariscos realizado en 2001, en los Países Bajos (Van Egmond *et al.*, 2004). Lawrence modificó este método una vez más y se evaluó en 2002, en un estudio conjunto internacional (Lawrence *et al.*, 2003).

técnicas electroforéticas

electroforesis en gel

Boyer *et al.* (1979), Onoue *et al.* (1983), Ikawa *et al.* (1985) y Thibault *et al.* (1991) desarrollaron distintos métodos de electroforesis en gel o en papel para separar las toxinas PSP. En teoría, la técnica en un recipiente y en una sola dimensión, permitiría clasificar rápidamente varias muestras. Sin embargo, la cuantificación constituye el obstáculo más importante y la mayoría de los métodos utilizan nebulización con peróxido y una lámpara UV para visualizar las toxinas en la placa electroforética. Para sortear el obstáculo se planteó como alternativa utilizar detectores de barrido fluorescente (Van Egmond *et al.*, 1993).

electroforesis capilar

La electroforesis capilar es una técnica relativamente nueva que, hasta la fecha, se ha utilizado pocas veces en el análisis de toxinas, pero cuya flexibilidad amerita continuar investigando su utilización. En resumen, la técnica utiliza un capilar fino de sílice fundido (~100 µm de diámetro interno) en lugar de gel electroforético y el procedimiento consiste en introducir cantidades de la muestra, en nanolitros, por uno de los extremos de la columna, antes de usarla como puente entre dos recipientes con agentes tampón. Al aplicar un voltaje alto, las toxinas migran a través de la columna y se detectan a medida que pasan por una célula de fluorescencia o de rayos UV. La técnica se utiliza con una amplia gama de compuestos con movilidad electroforética e incluso con compuestos que no tienen una carga neta, ya que estos forman micelas que sí migran.

Wright *et al.* (1989) determinaron estándares de STX con un sistema de electroforesis capilar acoplado a un detector de fluorescencia láser. La técnica permite detectar concentraciones de STX de 1 µg/kg.

Si bien el volumen de inyección es necesariamente muy pequeño, entre 1 y 10 nL, los límites de detección teóricos en las muestras son de $\mu\text{g/kg}$. Hasta la fecha, las desventajas de la técnica son que no se ha demostrado la misma separación en biota con toxinas mezcladas, que el equipo no está disponible comercialmente, que es costoso y que la metodología presenta los mismos problemas que la CL, es decir, es necesario preparar un derivado fluorescente antes de proceder a la separación o a la detección.

Thibault *et al.* (1991) utilizaron la electroforesis capilar con muestras de biota marina y lograron separar la neoSTX y la STX, con un límite de detección de 5 μM (aproximadamente 1,5 $\mu\text{g/ml}$) con espectrometría UV. Los autores sugieren que la técnica de electroforesis capilar con detección UV cuenta con un potencial prometedor para el análisis rutinario de estas toxinas en extractos naturales, aunque, en la actualidad, los límites de detección todavía se consideran demasiado altos como para utilizar la metodología en programas de control.

espectrometría de masas

En las últimas dos décadas se promovió la detección de biotoxinas marinas por espectrometría de masas, no solo mediante el desarrollo de la CL acoplada a EM, sino también mediante la integración de tecnologías computarizadas, de detección y de separación. La clave del éxito y de la creciente utilización de la CL acoplada a EM (incluida la CL acoplada a EM en tándem) es, y será, la cantidad y calidad de los resultados obtenidos, la confiabilidad, el bajo costo y la disponibilidad comercial de los sistemas (Willoughby *et al.*, 1998).

Hacia fines de la década de los años ochenta Quilliam *et al.* (1989) informaban de la determinación de la STX por CL acoplada a EM con una técnica de ionización “ion-sprayTM”, nombre comercial de la electronebulización asistida neumáticamente (Sparkman, 2000). El análisis de inyección de flujos con seguimiento con ión selectivo (modo SIM, por sus siglas en inglés) y concentrándose en los iones positivos permitió estimar un límite de detección de concentraciones de 0,1 μM (con una inyección de 1 μL), es decir aproximadamente cinco veces más sensible que el bioensayo en ratón de la AOAC. Los espectros con barrido completo de 100 ng de STX y los espectros del ión producto (ión hijo) de una única molécula protonada ($[\text{M}+\text{H}]^+$) suministraron información útil para confirmar la identidad y desarrollar un método de seguimiento selectivo de la reacción (SRM, por sus siglas en inglés).

Pleasant *et al.* (1992a) estudiaron la CL acoplada a EM y la EC acoplada a EM para analizar las toxinas PSP. Los autores utilizaron EM (modo EM¹ con barrido completo y control de iones específicos) acoplada a CL para controlar la purificación de la saxitoxina aislada de extractos de células de dinoflagelados. La espectrometría de masas en tándem (EM²) se utilizó para obtener información estructural. Según parece, los métodos detectan 10 pg inyectados, que equivalen a una concentración de 0,03 μM , mejoría obtenida cambiando la fase móvil y disminuyendo la velocidad de flujo. Los autores presentan una curva de calibración para soluciones estándar (calibración externa) con un rango de concentración de relación 55 (concentraciones máxima/ mínima). Si bien el panorama es prometedor, faltan valores para los indicadores de linealidad y reproducibilidad (r^2 y desviación estándar, respectivamente). Los autores trataron de forma exhaustiva la posible aplicación del análisis de inyección de flujo a la determinación de toxinas PSP en extractos marinos más complejos y concluyeron que tiene serias limitaciones.

Quilliam *et al.* (1993) estudiaron los aspectos cualitativos de la CL acoplada a EM. El estudio trató la caracterización de los productos de la oxidación con periodato de las toxinas PSP y obtuvieron los espectros másicos (especialmente los espectros EM¹) de varios de ellos. Los autores observaron una marcada reducción de la sensibilidad (respuesta relativa) de estos productos de la oxidación con respecto a las toxinas progenitoras. Concluyeron que “En general la sensibilidad es tal que la oxidación pre-columna combinada con CL acoplada a EM, no constituye un método competitivo para analizar las toxinas PSP en cantidades traza.”

Jaime *et al* (2001) mencionan un método para la cuantificación de las PSP utilizando cromatografía con intercambio iónico acoplada a espectrometría de masas con ionización por electronebulización. Los autores realizaron la separación cromatográfica por elución del gradiente, tomaron las medidas con modo de control de iones específicos y describieron los sistemas automatizados. El estudio se centró en los límites de detección y en la linealidad: “los LD obtenidos para las toxinas PSP individuales son comparables a los de otros métodos de cromatografía de par iónico con oxidación química y detección fluorescente”, que se adaptan bien a la determinación de toxinas PSP en materiales biológicos (límite reglamentario mencionado para mejillones y mariscos de 800 µg de PSP/kg). La linealidad se demostró con buenos coeficientes de correlación ($> 0,99$), obtenidos a pesar del rango de calibración de la concentración limitado (aproximadamente una década en promedio).

Quilliam *et al.* (2001; 2002) proponen varios métodos de determinación de toxinas PSP por CL acoplada a EM. Los autores mencionan especialmente la detección por cromatografía líquida con interacción hidrófila acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por electronebulización. Sostienen que cuentan con un método que detecta todas las toxinas PSP en una sola corrida, pero hasta la fecha no ha sido publicado.

Oikawa *et al.* (2002) utilizaron un método de CL acoplada a EM para confirmar la acumulación de toxinas PSP (toxinas GNTX y C) en el cangrejo comestible, aunque no describieron la cuantificación con CL acoplada a EM. Para la EM con ionización por electronebulización se realizó la purificación parcial, es decir, un tratamiento consecutivo con carbón activado y una columna de Bio-Gel P2.

En resumen, las publicaciones científicas sobre CL acoplada a EM para el análisis de toxinas PSP se centran principalmente en los aspectos cualitativos y muestran la utilización convencional del modo EM¹, aunque sí se han utilizado equipos en tándem. El análisis de toxinas PSP por CL acoplada a EM en tandem se presentó recientemente, pero aún no se publicó.

2.3 Organismos fuente y hábitat

2.3.1 Organismos fuente

Las toxinas PSP se encuentran en algunos géneros de dinoflagelados y en una especie de algas verde-azuladas. Las especies del género *Alexandrium* (conocido como *Gonyaulax* o *Protogonyaulax*) identificadas como contaminantes de los mariscos son: *Alexandrium tamarensis*, *A. minutum* (syn. *A. excavata*), *A. catenella*, *A. fraterculus*, *A. fundyense* y *A. cohorticula*. Otras especies de dinoflagelados, que también se identificaron como fuente de STX son *Pyrodinium bahamense* y *Gymnodinium catenatum* (Mons *et al.*, 1998). La toxicidad de los dinoflagelados varía según la mezcla de derivados de STX, cuya composición difiere según la especie que los produce y/o la región en que se presentan.

El perfil de toxinas de *A. minutum* en Marlborough, Nueva Zelanda, está compuesto, en general, por distintas cantidades de GNTX1, GNTX2, GNTX4, neoSTX y STX (ver la Figura 2.1). Estos perfiles son similares a los observados en otros cultivos aislados de *A. minutum* en Nueva Zelanda, pero difieren de los observados en esta misma especie de otros lugares del mundo (MacKenzie y Berkett, 1997).

Algunos dinoflagelados tienen una forma inmóvil: un quiste de resistencia o hipnocigoto. Estos quistes descienden al fondo del mar y se acumulan en el límite entre el agua y el sedimento, donde hibernan (Mons *et al.*, 1998). Una vez que las condiciones de crecimiento se vuelven favorables, los quistes germinan y vuelven a inocular el agua con células nadadoras, que pueden entonces resultar en floraciones, asegurando así la supervivencia de ciertos dinoflagelados de estación en estación. El quiste en sí también es tóxico, pero ésta aún no se ha determinado con certeza. Algunos investigadores sostienen que es similar a la del dinoflagelado. Otros afirman que las concentraciones de toxinas PSP en los quistes son entre 10 y 1 000 veces superiores a las de las células móviles (Mons *et al.*, 1998). En la Bahía de Yakarta, en Indonesia, se encontraron formas móviles de *Pyrodinium*

bahamense inmediatamente después de hallar los quistes de la misma especie en sedimentos superficiales y probablemente la especie cumpla su ciclo de vida completo en dicha bahía (Matsuoka *et al.*, 1998). En las costas de Portugal se encontraron quistes de los tres grupos principales de dinoflagelados tóxicos o potencialmente tóxicos: i) en toda la costa se encontraron quistes de *G. catenatum*, los que en la costa suroeste constituían hasta el 68 por ciento del total; ii) en la zona este, sobre el Océano Atlántico se encontraron quistes de *P. bahamense*; y iii) en toda la costa se encontraron quistes del género *Alexandrium*, los que en la costa sur constituían entre el ocho y el 31 por ciento del total (Amorim y Dale, 1998).

Además de los *Protistas*, la especie *Aphanazomenon flos-aquae*, una cianofita de agua dulce, también contiene STX y neosaxitoxina (neoSTX) (Mons *et al.*, 1998). Otros investigadores han señalado la presencia de componentes de PSP en mariscos y cangrejos, por ejemplo en *Spondylus butler* y *Zosimus acnus* (Mons *et al.*, 1998), sin constatar la presencia de *Protistas* tóxicos. No se ha esclarecido en qué medida esto se debe al consumo de algas del arrecife coralino. Por otro lado, los autores de un estudio reciente sobre la producción de quistes de dinoflagelados en el Golfo de Nápoles observaron que durante los meses de verano, los quistes esféricos y de paredes lisas germinan y producen individuos de la especie *A. andersonii*. Si bien esta especie no se consideraba tóxica, Ciminiello *et al.* (2000c) analizaron un cultivo clonal por bioensayo en ratón y obtuvieron resultados positivos para PSP.

2.3.2 Condiciones favorables

Ni el momento en que aparece una floración, ni la densidad de la población son predecibles. La floración comienza como una pequeña población de células de dinoflagelados tóxicos en fase latente o como quistes de resistencia depositados en el sedimento del fondo. El momento en que los quistes comienzan a germinar y el lugar donde han estado depositados determinan cuando y donde aparecerá una floración. Ciertas condiciones climáticas y medioambientales, como por ejemplo cambios en la salinidad, un aumento de la temperatura del agua, de los nutrientes y de la radiación solar fomentan la germinación de los quistes, que ingresan en un estado vegetativo, en el que se reproducen rápidamente. Una vez desencadenada la floración, se ingresa en una fase de crecimiento exponencial de la población que resulta en un aumento descomunal de la misma. El mayor porcentaje de células tóxicas se registra generalmente en la mitad de esta fase de crecimiento exponencial. A medida que transcurre el tiempo, la floración causa una marcada disminución de nutrientes y del contenido del dióxido de carbono en el agua y degrada las condiciones medioambientales, limitando el crecimiento de la población. Ingresa, entonces, en una fase estacionaria, se estabiliza y el agua adquiere un color rojizo fluorescente, que se conoce como marea roja. La degradación medioambiental continúa y aumenta la muerte celular hasta que la población se destruye. En esta etapa, muchas especies de dinoflagelados forman quistes de resistencia que se hunden al fondo, a la espera de la próxima floración (Mons *et al.*, 1998).

En aguas costeras y de estuarios (con temperaturas entre 13 y 25 °C) de la provincia de Nueva Gales del Sur, en Australia, abundan los bancos de quistes de *A. catenella*. El período de latencia de los quistes de cultivos aislados en Australia ocurre a 17 °C y dura entre 28 y 55 días solamente, a diferencia de los períodos más largos de poblaciones templadas de *A. catenella* en Japón (97 días a 23 °C) y de *A. tamarensis* en Cape Cod, Estados Unidos, o en Columbia Británica, Canadá. El aumento de la temperatura de 17 a 25 °C durante una hora fomenta, en algunos casos, la germinación, hasta un 100 por ciento (luego de 98 días) de los quistes de ciertos cultivos de *A. catenella* de Australia. Por otro lado, los requisitos de latencia permanecieron incambiables en los cultivos que se mantuvieron en frío y a oscuras, a diferencia de lo observado en quistes de poblaciones templadas en hibernación de otros países. Estos datos indican que las condiciones de latencia de quistes de cultivos aislados de un mismo taxón de dinoflagelado, provenientes de distintos lugares geográficos, no son necesariamente idénticas (Hallegraeff *et al.*, 1998).

Taroncher-Oldenburg *et al.* (1997) observaron que la producción de toxinas en *A. fundyense* es discontinua, está inducida por la radiación solar y siempre ocurre en un período de tiempo definido, entre aproximadamente 8 y 10 horas, en la fase G1 temprana del ciclo celular y se reduce a cero durante el resto de la interfase y de la mitosis.

Los dinoflagelados se desarrollan a temperaturas relativamente altas y con abundante radiación solar, por lo que en Europa y en Sudáfrica los casos de intoxicación y la mortalidad ocurren generalmente entre mayo y noviembre, mientras que en América del Norte ocurren entre julio y setiembre (Mons *et al.*, 1998).

El tipo de hábitat donde se han observado las intoxicaciones por PSP varía considerablemente y se cree que las condiciones hidrográficas juegan un papel importante. Ciertos factores indirectos, como la fuerza del viento y la turbulencia del agua influyen en la formación de una capa termoclina, es decir una capa de agua de mar superior que no se mezcla con el agua que está por debajo, cuya presencia es de suma importancia (Mons *et al.*, 1998).

Hao (2001) estudió las características de crecimiento de *A. tamarensis* con cultivos artificiales en el laboratorio. Según los resultados obtenidos, el autor concluyó que las condiciones óptimas para el crecimiento son: temperatura entre 22 y 26 °C, salinidad entre 28 y 31 ‰; intensidad de luz entre 1500 y 2500 lux y relación luz/oscuridad de 16/8 horas. El tiempo de duplicación promedio es de 85 horas (Hao, 2001).

El Niño es un fenómeno causado por un desequilibrio de la presión atmosférica y de las temperaturas del este y del oeste del Océano Pacífico, que provoca una disminución de la profundidad de la capa termoclina. Se encontraron pruebas de la coincidencia de floraciones de *Pyrodinium* y los cambios climáticos ocasionados por el Fenómeno de Oscilación Austral del Niño (ENSO) (Mons *et al.*, 1998).

Los organismos necesitan satisfacer sus necesidades y es imprescindible que la cantidad de nutrientes del agua de mar sea la adecuada, especialmente en lo que respecta a la concentración de elementos traza, quelatos, vitaminas y material orgánico en general. Sin embargo, el rol exacto que juegan los nutrientes en el desarrollo de las mareas rojas aún no se ha determinado con certeza. En algunos casos, bajas concentraciones de sal estimulan el desarrollo de la marea roja, pero otras veces parecería ser que son las altas concentraciones salinas las que inducen la floración (Mons *et al.*, 1998).

La irradiación es otro de los factores que afecta el crecimiento. El crecimiento de *A. minutum*, se estudió en un cultivo de un brote en Nueva Zelanda (en la Bahía Plenty), con 54 combinaciones de irradiación y distintas fuentes de N (NO_3^- , NH_4^+ y urea) en concentraciones variables. El efecto de la irradiación en el crecimiento es mayor en cultivos enriquecidos con NO_3^- , que en los enriquecidos con NH_4^+ o con urea. Se observó que el crecimiento se saturó con irradiaciones relativamente bajas, lo que sugiere que las tasas de crecimiento de *A. minutum* pueden mantenerse relativamente buenas, incluso a profundidades poco iluminadas de la columna de agua (Chang y McLean, 1997). Las condiciones medioambientales óptimas para el crecimiento celular y para la producción de toxinas de un cultivo aislado de *A. minutum* en fase T1, de Taiwan, Provincia de China fueron: 25 °C de temperatura, pH 7,5, 120 $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad de luz y 15 ‰ de salinidad. Las concentraciones óptimas de nutrientes agregados al medio con 50 por ciento de agua de mar natural fueron: 0,02 por ciento de fosfato, 0,01 por ciento de nitrato, 5,0 ng/g de ión cúprico, 270 ng/g de ión férrico y ácido húmico libre. La toxicidad celular y la toxicidad total máximas se registraron en la fase de crecimiento post-estacionario y luego decayeron rápidamente (Hwang y Lu, 2000).

En un estudio con un cultivo aislado en el laboratorio de *A. catenella*, de China, Región Administrativa Especial de Hong Kong, las concentraciones máximas de toxina por litro del medio se registraron a 20 °C, al principio de la fase estacionaria (luego de cuatro horas de oscuridad y con una duración de cuatro a cinco horas), cuando la densidad celular estaba en su punto más alto y la cantidad de toxina por célula aún era relativamente elevada. La densidad celular registrada a 10 °C fue baja,

pero la cantidad de toxina por célula alta. A 30 °C, la densidad de la población en pleno, al igual que la cantidad de toxina por célula fueron bajas (Siu *et al.*, 1997).

La relación N:P es otro de los factores que afecta la producción de toxinas durante la proliferación. La literatura cita varios estudios que describen los efectos de distintas relaciones N:P en el crecimiento de *Alexandrium* spp. y en el contenido de toxinas (Mons *et al.*, 1998; Béchemin *et al.*, 1999; John y Flynn, 2000). Una disminución del nitrógeno limita el crecimiento de la población y la producción de toxinas, mientras que una disminución del fósforo limita solamente el crecimiento de la población y fomenta la producción de toxinas. En la especie *A. catenella*, si los nutrientes no constituyen un factor limitante, los principales factores limitantes son: la temperatura (entre 20 y 25 °C), la salinidad (entre 30 y 35 ‰) y el pH (entre 8,0 y 8,5) (Siu *et al.*, 1997).

Los distintos autores que han estudiado la participación de las eubacterias, diferentes de las algas verde-azuladas, en la producción de toxinas PSP aún no están de acuerdo. Algunos sugieren que las bacterias juegan un papel en la producción de toxinas, aunque los mecanismos todavía no se conocen con exactitud. Es probable que la producción de toxinas PSP sea una función inherente a algunas bacterias marinas y necesaria en su proceso fisiológico, pero incidental en relación a la toxicidad de los mariscos y dinoflagelados. Varios estudios han demostrado que las bacterias cuentan con la capacidad de metabolizar las toxinas PSP. Esta función reviste importancia práctica en términos de toxicidad, tanto de los mariscos como de los dinoflagelados. Es necesario continuar investigando en profundidad las interacciones entre las bacterias y los dinoflagelados en ambientes marinos (Gallacher y Smith, 1999).

2.3.3 Hábitat

Los dinoflagelados y sus quistes se han encontrado principalmente en aguas próximas a América del Norte, Europa y Japón, aunque aumentan los informes de su presencia en Asia (Mons *et al.*, 1998). En el noreste de Canadá, las PSP se hallaron hace ya más de 100 años. En el noreste de EE.UU., especialmente en la región de Nueva Inglaterra, donde la toxicidad se encontraba restringida a ciertas áreas del extremo este de Maine, cerca de la frontera con Canadá, los primeros casos de PSP datan de 1958 (Anderson, 1997).

La especie *A. catenella* se halla especialmente en las costas de América del Norte, del sur de Japón y Venezuela; *A. tamarensis* en América del Norte, en el norte de Japón, en el sur de Europa, en Turquía y Australia (Mons *et al.*, 1998). En aguas costeras y de los estuarios, con temperaturas entre 13 y 25 °C, en la provincia de Nueva Gales del Sur, Australia, abundan los bancos de quistes de *A. catenella*. El período de latencia de los quistes de cultivos aislados en Australia ocurre a 17 °C y dura entre 28 y 55 días solamente, a diferencia de los períodos más largos de poblaciones templadas de *A. catenella* en Japón (97 días a 23 °C) y de *A. tamarensis* en Cape Cod o en Columbia Británica (Hallegraeff *et al.*, 1998).

En aguas costeras del noreste de América del Norte se halla la especie *A. fundyense* (Taroncher-Oldenburg *et al.*, 1997) y en el Golfo de Maine se observó que las floraciones de *Protogonyaulax tamarensis* son comunes en ciertas estaciones (Shumway *et al.*, 1988).

La especie *A. excavata* (syn. *A. minutum*) se halló en las costas del noreste de América del Norte, Egipto, Australia, el Mar del Norte (Dinamarca, Alemania, los Países Bajos, Noruega y el Reino Unido), en la costa mediterránea (Mons *et al.*, 1998) y en Nueva Zelanda (Chang *et al.*, 1997a). *A. minutum* se detecta desde 1990, en una laguna en Sicilia, Italia, donde se explotan los bancos naturales de almejas (*Ruditapes decussata* y *Cardium* spp.) y se cultiva el mejillón común (*Mitylus galloprovincialis*) en pequeña escala. No se ha informado de casos de intoxicación en seres humanos. Las densidades máximas de células se observan en mayo (Giacobbe *et al.*, 1996). En 1994, 1995 y 1996, entre abril y julio se encontró *A. minutum* en las estaciones de muestreo de Emilia Romagna, en la costa del noroeste del Mar Adriático, en Italia (Poletti *et al.*, 1998). Hasta la fecha, en el Mar

Mediterráneo solo se hallaron *A. minutum* y *A. tamarensis*, ambas con potencial tóxico. Sin embargo, Ciminiello *et al.* (2000c) realizaron un estudio con material de cultivo compuesto por quistes del Golfo de Nápoles que germinaron en *A. andersoni*, y obtuvieron resultados positivos para PSP por bioensayo en ratón. El perfil de toxicidad de *A. andersoni* está compuesto principalmente por toxinas de la clase STX, especialmente STX y neoSTX.

Las floraciones de *Gymnodinium catenatum* causaron brotes de PSP en Japón, en la costa noroeste de América del Norte, en el sur de Irlanda, en España, Méjico, Argentina y Tasmania, en Australia. Actualmente, la distribución de la especie incluye el Golfo de California, el Golfo de México, Argentina, Venezuela, Japón, las Filipinas, Palau, Tasmania, el Mar Mediterráneo y la costa atlántica de España y Portugal (Mons *et al.*, 1998). En el caso de Tasmania, la especie no es endémica, sino que fue introducida hace ya algunas décadas. La primera floración se registró en 1980 y luego se observaron floraciones importantes en 1986, 1991 y 1993. Muchos indicios apuntan a que probablemente la especie se introdujo por el vaciado de las aguas de lastre de buques de carga provenientes de Japón y de la República de Corea y, menos frecuentemente, de Europa (McMinn *et al.*, 1997).

En 1972 se observaron las primeras consecuencias perjudiciales de las floraciones de *Pyrodinium* en Papua Nueva Guinea. Desde entonces, las floraciones parecen haberse extendido a Brunei Darussalam, Sabah, en Malasia, y a las costas del centro y norte de las Filipinas. En 1987 en Champerico, en la costa guatemalteca sobre el Océano Pacífico, 187 personas fueron hospitalizadas y 26 murieron durante una floración de *Pyrodinium* (Rodrigue *et al.*, 1990). En 1989, otra floración en la costa del Pacífico de América Central se extendió hacia el norte, causando varios casos de intoxicación y muertes (Mons *et al.*, 1998).

El riesgo de PSP asociado a *A. ostentfeldii* es bajo, según demostró la medición directa de la toxicidad específica en cultivos aislados. La especie se ha descrito en numerosos sitios en la costa oeste de Europa, como en Islandia, las Islas Faeroe, en Dinamarca, Noruega y España, así como también en Egipto, en la costa oeste de EE.UU., en el Golfo de St. Lawrence, en Canadá y en la región del este asiático de la Federación Rusa. La literatura indica que los quistes de *A. ostentfeldii* son comunes en los sedimentos de la costa neocelandesa (Levasseur *et al.*, 1998; Mackenzie *et al.*, 1996).

2.4 Presencia y acumulación en frutos del mar

2.4.1 Incorporación y eliminación de las toxinas PSP en los organismos acuáticos

La filtración transporta las células y los quistes de dinoflagelados al esófago y al estómago de los moluscos bivalvos. La digestión, que ocurre en el estómago y en los divertículos, es el proceso por el cual las toxinas PSP se liberan y entran a los órganos digestivos. La mezcla de toxinas que se aloja en los tejidos del marisco varía según el tipo de marisco del que se trate, la especie y la cepa del dinoflagelado en cuestión. La concentración de las toxinas que componen la muestra varía con el tiempo y en función de otros factores, como las condiciones medioambientales. El 96 por ciento de la toxicidad total se encuentra en las vísceras del mejillón que constituyen solamente el 30 por ciento del peso del tejido total. En las almejas, las toxinas se acumulan rápidamente en las vísceras, para luego disminuir gradualmente. Luego de un período de latencia de cuatro semanas o más, las toxinas se detectan principalmente en el sifón, aunque pueden alojarse en otras partes del animal, y su composición varía con el tiempo (Mons *et al.*, 1998).

Varios autores estudiaron la toxicidad de los distintos tejidos de las vieiras observando las siguientes generalidades (Shumway *et al.*, 1988):

- El músculo aductor no acumula toxinas y de hecho se ha probado que inactiva las toxinas presentes. La vieira de roca, *Hinnites giganteus*, es una excepción ya que las concentraciones de toxinas alcanzaron 2 000 µg/100 g de tejido.
- Los tejidos de las glándulas digestivas, el manto, las gónadas y las branquias retienen toxinas, variando la cantidad según el tejido y la especie.
- La toxicidad de los diferentes tejidos varía con la estación.

Una vez absorbidas y distribuidas, las toxinas pueden transformarse. Se alimentaron almejas amarillas no tóxicas con *A. catenella* con GNTX 1-4 y neoSTX, pero sin STX. La STX se detectó luego de 83 días, lo que llevó a los autores a concluir que *in vivo* ocurre algún tipo de síntesis o biotransformación de la GNTX 1-4 y/o neoSTX en STX. Otros autores obtuvieron resultados similares (Mons *et al.*, 1998).

La epimerización es una transformación común que ocurre cuando se reacomoda una porción de la molécula original de STX. En vieiras y mejillones, por ejemplo, la epimerización de la STX de un alga tóxica ocurre cuando el H y el grupo OSO_3^- se intercambian en la posición 11 de la molécula de STX. Esta transformación disminuye la toxicidad once veces. Por el contrario, otras transformaciones aumentan la toxicidad. La hidrólisis ácida causa la separación del grupo SO_3^- de la posición 21 de la molécula de STX y aumenta la toxicidad seis veces (Mons *et al.*, 1998).

En la almeja amarilla, la molécula de STX altamente tóxica, se une químicamente al tejido del sifón. Esta almeja es capaz de retener las toxinas PSP por períodos de hasta dos años luego de la ingestión inicial. La almejuela común, *Prothotaca staminea*, también puede convertirse en tóxica, aunque no tanto como la almeja amarilla. Esto se debe, en parte, a su capacidad de transformar las toxinas STX muy tóxicas en formas de toxicidad moderada. El efecto combinado de la almejuela común de transformar las STX en formas menos tóxicas y la capacidad de la almeja amarilla de concentrar y retener las formas muy tóxicas, puede resultar en una gran diferencia de toxicidad entre las dos especies. Esta diferencia es significativa ya que ambas especies coexisten en las mismas playas y, para un recolector aficionado, son muy similares (Mons *et al.*, 1998). MacKenzie *et al.* (1996) estudiaron los cambios de los perfiles de toxinas PSP en la almeja *Paphies subtriangulata*, de las playas de la Bahía Plenty, en Nueva Zelanda. El estudio se realizó durante la fase de contaminación (con picos $\leq 412 \mu\text{g eq de STX}/100 \text{ g}$) en enero de 1993 y durante seis meses un año más tarde, cuando aún persistían concentraciones de toxinas bajas ($40 \mu\text{g}/100 \text{ g}$). Durante el pico de contaminación, los perfiles se componen con distintas cantidades de derivados del carbamato, GNTX 1-4, neoSTX y STX con trazas del derivado decarbamoil, dc-STX. Estos perfiles son similares a los producidos por *A. minutum*, el dinoflagelado responsable del incidente de PSP. Un año más tarde sólo se observaron trazas de los diferentes derivados de la STX. Casi todas las toxinas se encontraron alojadas en el sifón.

Andrinolo *et al.* (1999a) demostraron que la depuración natural de toxinas PSP en *Aulacomya ater*, un bivalvo que se alimenta por filtración originario de América del Sur, ocurre como una caída exponencial de primer orden (modelo de un compartimiento). Los bivalvos se clasifican según la cinética de la eliminación de las toxinas, en dos grandes grupos: los que eliminan las toxinas lentamente (por ejemplo, *Saxidomus giganteus*, *Spisula solidissima*, *Placopecten magellanicus*, *Patinopecten yessoensis*) y los que lo hacen rápida y moderadamente (por ejemplo *Mitylus edulis* y *Mya arenaria*) (Androlino *et al.*, 1999a). En algunas especies, el modelo bifásico de dos compartimientos es la manera mejor de describir la cinética de la eliminación de las toxinas. Durante la acumulación, la toxicidad de las vísceras es, generalmente, entre dos y cinco veces mayor que la de los tejidos enteros, y los menos tóxicos son los tejidos locomotores (los pies y el músculo aductor). Sin embargo, la eliminación de toxinas de las vísceras ocurre más rápidamente que de otros tejidos, causando, una disminución uniforme de su contribución a la carga de toxinas total. La biotransformación de toxinas en los tejidos es más pronunciada en ciertas especies de almejas capaces de efectuar la decarbamoilización enzimática, por ejemplo *Prothotaca staminea*, y es más limitada en otras especies, por ejemplo *Mya arenaria* y *Mitylus edulis*. En general, los cambios en el perfil de las toxinas son mayores cuando los dinoflagelados ingeridos contienen gran cantidad de toxinas N-sulfocarbamoil de poca potencia (Bricelj y Shumway, 1998).

Algunos bivalvos pueden evitar la ingestión de dinoflagelados tóxicos. La chirila mercenaria, *Mercenaria mercenaria*, por ejemplo, retrae el sifón y cierra sus válvulas ante la presencia de especies de *Alexandrium* (Mons *et al.*, 1998).

Blanco *et al.* (1997) estudiaron la cinética de la eliminación de toxinas en los mejillones, *Mitylus galloprovincialis*, expuestos a una floración de *G. catenatum*, un dinoflagelado productor de toxinas PSP. El perfil de toxinas del mejillón es muy similar al de *G. catenatum*, lo que indica que, en este caso, la biotransformación tiene muy poca o ninguna importancia. La eliminación de toxinas ocurre en dos etapas:

- i. una etapa rápida, al principio del período de eliminación de toxinas (una vez transcurridos un par de días del comienzo de la eliminación, en comparación con la cantidad inicial, solo se encuentran pequeñas cantidades de toxina en el bivalvo), y
- ii. una etapa lenta, desde el fin de la primera etapa hasta que finaliza la eliminación. Los factores que afectan la eliminación, principalmente durante la primera etapa, son las condiciones medioambientales (salinidad, temperatura y transmisión de la luz) y el peso corporal.

Wildish *et al.* (1998) observaron que los ostiones del Pacífico (*Crassostrea gigas*) que se alimentan con *A. tamarensis* y *A. fundyense*, tóxicos y no tóxicos, abren y cierran la bomba del filtro, lo que sugiere que las toxinas PSP no estaban directamente involucradas en la inhibición de la respuesta inicial a la alimentación. En ostiones de control alimentados con *Isochrysis* sp., una microalga de referencia, que fomenta el crecimiento, no se observó este comportamiento. Se observó evidencia adicional del comportamiento de apertura/cierre al alimentar ostiones del Pacífico, aclimatados a *Isochrysis* sp., con mezclas de *Alexandrium/Isochrysis*.

Lassus *et al.* (2000) estudiaron la eliminación de toxinas con un grupo de individuos adultos de ostiones del Pacífico, *Crassostrea gigas*, contaminados experimentalmente con toxinas PSP (por exposición a *A. minutum*) en concentraciones entre 150 y 300 µg eq de STX/100 g y alimentados con dietas de diatomeas o dinoflagelados no tóxicos. Si bien la cantidad de toxinas varió de individuo en individuo, los autores determinaron que el tiempo de eliminación de toxinas es entre tres y cuatro días hasta alcanzar el umbral de seguridad de 80 µg/100 g en el ostión. Las tasas de eliminación de distintos grupos de ostiones alimentados con *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Thalassiosira weissflogii* o con *Skeletonema costatum* no presentaron diferencias significativas. Los autores observaron que el perfil de toxinas durante el proceso de depuración está dominado por GNTX2 y GNTX3, mientras que los porcentajes de toxinas C son relativamente bajos y la STX y neoSTX no detectables. El perfil de toxinas es igual al de *A. minutum* lo que sugiere que en el ostión no hay biotransformación.

Las vieiras de la especie *Chlamys farreri* tienen gran capacidad de acumulación de toxinas PSP. Sus vísceras contienen hasta 5 000 µg eq de STX/100 g luego de una exposición a *A. minutum* tóxica de 48 horas de duración con tasa de eliminación lenta. Las vísceras contienen el 97 por ciento del total de toxinas. La relación entre las distintas toxinas PSP cambió durante el período experimental. La relación entre GNTX1 y GNTX4 con respecto al total de toxinas disminuyó mientras que la de GNTX2 y GNTX3 aumentó. El perfil de toxinas en las vieiras difiere del que presentan las algas y el de las heces de las vieiras se corresponde con el de la etapa temprana de cultivos de *A. minutum* (Zou *et al.*, 2001).

Bagøien *et al.* (1996) realizaron un estudio con ejemplares adultos de *Euterpina acutifrons*, un copépodo harpacticoide pelágico, que incubaron en grandes recipientes (de 20 litros) con una cepa muy tóxica de *A. minutum* (1 000 o 10 000 células por ml) hasta cinco días. El análisis de los extractos por CL reveló solamente trazas de toxinas PSP. Los autores observaron que luego de transcurridos uno o dos días, permanecen inactivos entre un diez y un 15 por ciento de los copépodos alimentados con una cepa muy tóxica y otra poco tóxica de *A. minutum* (1 000 y 10 000 células por ml). Sugieren que luego de probar unas pocas células, la especie *E. acutifrons* evita alimentarse con estos dinoflagelados.

Chen y Chou (1998) realizaron un estudio con un grupo de almejas, *Hiatula diplos*, al que alimentaron con células de *A. minutum*. Luego alimentaron a un grupo de *Babylonia areolata*, un gastrópodo carnívoro, con estas almejas contaminadas con PSP. La composición de las toxinas en las almejas, en los gastrópodos y en los dinoflagelados es similar, pero el perfil en los gastrópodos es diferente. Los autores observaron una degradación notable de la GNTX1 en los gastrópodos,

comparativamente con las almejas y los dinoflagelados, lo que provocó una disminución de la toxicidad, aunque la cantidad de toxinas aumentó de forma acumulativa. En las vísceras de los mariscos, sólo encontraron la GNTX1-4 transmitida por *A. minutum*. Chou y Chen (2001a) realizaron otro estudio a fin de determinar la acumulación, distribución y eliminación de las toxinas PSP en un grupo de almejas, *Hialuta rostrata*, alimentado con una cepa tóxica de *A. minutum*. Los autores confirmaron la alta toxicidad de la glándula digestiva. También constataron que la eficiencia de depuración del grupo de almejas tóxicas alimentadas con algas no tóxicas y del grupo de almejas sin alimento es similar. Al finalizar el período de alimentación, el perfil de las toxinas de las almejas es similar al de *A. minutum* (compuesto principalmente por GNTX4 y GNTX1). Sin embargo, al finalizar el período de eliminación, el perfil está compuesto principalmente por GNTX3 y GNTX2, lo que indica que las velocidades de eliminación o de transformación de las toxinas son dispares. Las únicas toxinas PSP encontradas fueron las GNTX1-4. Luego de alimentarse con algas tóxicas, otros tejidos además de las vísceras, también son tóxicos aunque con baja toxicidad y con perfil similar al de las algas tóxicas.

2.4.2 Mariscos con toxinas PSP

Si bien la mayoría de las especies de mariscos que se alimentan por filtración son relativamente poco sensibles a las toxinas STX, el mecanismo y la respuesta de cada una de ellas difiere. En condiciones similares parece que, en general, los mejillones, por ejemplo, acumulan más cantidad de toxinas PSP que las ostras. Los ensayos de alimentación en el laboratorio demostraron que los mejillones consumen rápidamente concentraciones de *Alexandrium* iguales o mayores que las que causan el cese del bombeo y el cierre de las ostras. Los resultados de los estudios electrofisiológicos con nervios aislados de bivalvos de la costa atlántica muestran que los de las ostras son sensibles a las toxinas, mientras que los del mejillón son relativamente poco sensibles (Mons *et al.*, 1998).

En zonas templadas, los mariscos asociados a casos de PSP son, principalmente, los moluscos bivalvos, es decir mejillones, almejas y en menor proporción ostras, vieiras y berberechos. El Cuadro 2.1 presenta una lista completa de los mariscos en los que se detectaron toxinas PSP.

En abril de 1991 se detectaron toxinas PSP en la oreja de mar de Europa, *Haliotis (Eurotis) tuberculata*, de la costa de Galicia, en España. En octubre de 1993 se cerró el mercado de este marisco. Las muestras recogidas en diciembre de 1995 contenían por bioensayo en ratón 252 ± 25 μg eq de STX/100 g de carne, y por CL 454 ± 86 μg eq de STX (la suma de STX y dcSTX convertida a equivalentes de STX utilizando los factores de conversión 1,9 y 1,14, respectivamente)/100 g de carne. Todos los valores obtenidos por bioensayo en ratón son superiores a 140 μg eq de STX/100 g de carne. El perfil está compuesto principalmente por dcSTX (entre 83 y 100 por ciento), aunque también se encontró STX en menor proporción. El epitelio contiene 2,6 veces la cantidad de toxinas presentes en el músculo. La eliminación natural de toxinas, manteniendo las orejas de mar bajo condiciones de laboratorio controladas durante tres meses, no dio buenos resultados. La eliminación del epitelio y de las vísceras resultaría en una disminución de la toxicidad del 75 por ciento (Bravo *et al.*, 1999).

En la especie *Chlamys nobilis*, de aguas de la Región Administrativa Especial de Hong Kong, en China, se encontraron concentraciones de 320 μg eq de STX/100 g de tejido. En la misma región se encontraron altas concentraciones de toxinas PSP en la especie *Perna viridis* luego de la marea roja de marzo y abril de 1998 (Zhou *et al.*, 1999). El 5 por ciento de las muestras de mariscos recolectadas desde el norte al sur de la costa china contenía toxinas PSP. Aunque las concentraciones detectadas fueron bajas (solo dos de las muestras presentaron concentraciones superiores al límite reglamentario) se encontraron productores de toxinas PSP en la región (Zhou *et al.*, 1999).

Cuadro2.1 Mariscos con toxinas PSP

Tipo	Nombre científico
Almejas	<i>Soletellina diphos</i> (sinónimo <i>Hiatula diphos</i>)
	<i>Saxidomus giganteus</i>
	<i>Tapes (Amygdala) japonica</i>
	<i>Protothaca staminea</i>
	<i>Siliqua patula</i>
	<i>Mya arenaria</i>
	<i>Spisula solidai</i>
	<i>Spisula solidissima</i>
	<i>Paphies subtriangulata</i> #
	<i>Venerupis rhomboides</i>
	<i>Ensis siliqua</i>
	<i>Donax trunculus</i>
	<i>Scrobicularia plana</i>
	<i>Chamalea striatula</i>
	<i>Venerupis pullastra</i>
	(sinónimo. <i>Venerupis rhomboides</i>)
	<i>Amphichaena kindermani</i>
	<i>Arctica islandica</i> ##
	<i>Mercenaria mercenaria</i> ##
	<i>Mesodesma arctatum</i> ##
Mejillones	<i>Mytilus edulis</i>
	<i>Mytilus californianus</i>
	<i>Pinna bicolor</i> *
	<i>Mytilus chilensis</i> **
Ostras	<i>Arctica islandica</i> ***
	<i>Aulocomya ater</i> **
	<i>Crassostrea gigas</i>
Berberechos	<i>Ostrea edulis</i>
	<i>Cerastoderma edule</i>
	<i>Acantocardia tuberculatum</i>
Gasterópodos	<i>Clinocardium nutalli</i>
	<i>Haliotis tuberculata</i>
	<i>Niotha clathrata</i>
	<i>Zeux scalaris</i>
Vieiras	<i>Concholepas concholepas</i> **
	<i>Argobuccinum ranelliformes</i> **
	<i>Placopecten magallanicus</i>
	<i>Patinopecten yessoensis</i>
	<i>Argopecten irradians</i>
	<i>Venus verrucosa</i>
	<i>Callista chione</i>
	<i>Chlamys farreri</i> *
	<i>Pecten albicans</i> *
	<i>Hinnites giganteus</i> ***
	<i>Buccinum</i> spp. ##
	<i>Colus</i> spp. ##
	<i>Thais</i> spp. ##
	<i>Homarus americanus</i> ##
Bocinas	<i>Buccinum</i> spp. ##
	<i>Colus</i> spp. ##
Langostas	<i>Thais</i> spp. ##
	<i>Homarus americanus</i> ##
	<i>Lunatia heros</i> ##

Fuente: , salvo que se indique otra fuente

* Takatani *et al.*, 1997; ** Lagos, 1998; *** Shumway *et al.*, 1988; # MacKenzie *et al.*, 1996; ## Todd (1997)

2.4.3 Otros organismos acuáticos con toxinas PSP

Teegarden y Cembella (1996) compararon los hábitos de alimentación de dos especies de copépodos comunes en el Golfo de Maine, *Acartia tonsa* y *Eurytemora herdmanni*. Los autores alimentaron distintos grupos de copépodos con cultivos aislados de especies de *Alexandrium*, con diferentes toxicidades por célula y perfiles de toxinas, y con un dinoflagelado no tóxico, *Lingulodinium polyedrum*. Los autores observaron que la toxicidad del dinoflagelado no afecta la eficiencia de alimentación de las dos especies de copépodos y ninguna de las especies presentó indicios muy claros de incapacidad o de efectos adversos resultantes de las toxinas ingeridas. Si bien los autores determinaron que en *E. herdmanni* la acumulación de toxinas PSP es mayor, las vísceras de esta especie son más grandes. Los experimentos realizados con mezclas de dinoflagelados apuntan a que ambas especies de copépodos tienen la capacidad de escoger sus presas según la palatabilidad y no según la toxicidad. Aunque la eficiencia de retención de toxinas de los copépodos estudiados son bajas (del 5 por ciento), se observó la acumulación de altas concentraciones de toxinas PSP. Esta acumulación apoya la hipótesis según la cual el zooplancton actúa como vector de toxinas de los niveles tróficos más altos.

Teegarden (1999) estudió tres especies de copépodos marinos (*Acartia tonsa*, *Centropagus hamatus* y *Eurytemora herdmanni*), que comparten el hábitat con especies de *Alexandrium* tóxicas. El autor observó que las tres especies son capaces de distinguir por medios químico sensoriales entre células tóxicas y no tóxicas de especies de *Alexandrium*. Esta distinción indica que la alimentación de los copépodos está regida por un comportamiento selectivo, más que por los efectos fisiológicos. Los hábitos de alimentación de las distintas especies de copépodos estudiados son diferentes, lo que sugiere diferencias en la presión de pastoreo que ejerce el zooplancton sobre las especies tóxicas de *Alexandrium*.

Bagøien *et al.* (1996) realizaron un estudio con ejemplares adultos de *Euterpina acutifrons*, un copépodo harpacticóide pelágico, que incubaron en grandes volúmenes (de 20 litros) con una cepa muy tóxica de *A. minutum* (1 000 o 10 000 células por ml) hasta cinco días. El análisis de los extractos por CL reveló solamente trazas de toxinas PSP. Los autores observaron que luego de uno o dos días, entre un diez y un 15 por ciento de los copépodos alimentados con una cepa muy tóxica y otra poco tóxica de *A. minutum* (1 000 y 10 000 células/ml) permanecen inactivos. Sugieren que luego de probar unas pocas células, la especie *E. acutifrons* evita alimentarse con estos dinoflagelados.

En Japón y en Fiji, la mayoría de los cangrejos que causaron casos de PSP en seres humanos son xántidos (*Lophozozymus pictor*), además de caracoles de mar y límulos. El denominador común de estas especies es el hábitat, todas de arrecifes coralinos, y que se alimentan por pastoreo superficial (Mons *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2000).

En Taiwan, Provincia de China se recolectaron 459 muestras de cangrejos xántidos entre octubre de 1992 y mayo de 1996. Las muestras se analizaron para detectar toxinas PSP y tetrodotoxina. Cinco especímenes (*Zosimus aeneus*, *Lophozozymus pictor*, *Atergatopsis germaini*, *Atergatis floridus*, *Demania reynaudi*) dieron resultados positivos para las toxinas PSP y la tetrodotoxina. Los porcentajes de toxinas PSP se situaron entre 11 y 97 por ciento (y entre el 89 y el 3 por ciento restante de tetrodotoxina). Si bien el perfil de toxinas PSP varía según la especie, la fuente es *A. minutum* (Hwang y Tsai, 1999).

A medida que las toxinas de las algas pasan por la cadena trófica pueden causar la muerte de peces. Hace algunos años, en la Bahía Fundy, toneladas de arenques murieron por ingerir pequeños caracoles planctónicos que habían consumido *Alexandrium*. Del punto de vista del ser humano, es muy positivo que el arenque, el bacalao, el salmón y otras especies de peces comerciales sean sensibles a las toxinas PSP y que, a diferencia de los mariscos, mueran antes que las concentraciones de toxinas en la carne alcancen grados peligrosos. Sin embargo, algunas toxinas se acumulan en el hígado y en otros órganos del pez y ponen en peligro a otros peces, a mamíferos marinos y aves, que ingieren el pez entero incluyendo las vísceras. En 1987, cuatro ballenas jorobadas murieron en la Bahía de Cape Cod,

en Massachussets. La autopsia reveló que habían ingerido caballas con elevadas concentraciones de STX en sus órganos (Mons *et al.*, 1998).

En mayo de 1996 se encontraron toxinas PSP en la estrella de mar, *Asterias amurensis*, del estuario del río Nikoh, Bahía Kure, Prefectura de Hiroshima, en Japón (8,0 UR/g en el cuerpo entero y 28,7 UR/g en vísceras, por bioensayo en ratón). Se cree que las toxinas PSP llegaron por la cadena trófica a partir de bivalvos tóxicos de la misma área. Las toxinas encontradas en la estrella de mar eran compuestos muy tóxicos con un perfil constituido principalmente por GNTX1, GNTX2, GNTX3, GNTX4, dc-GNTX3 y dc-STX, cuya suma representa aproximadamente 77 por ciento molar, además de derivados C1-C4 de N-sulfocarbamoil, con un claro predominio de la GNTX1, con 37,4 por ciento molar (Asakawa *et al.*, 1997).

Castonguay *et al.* (1997) estudiaron la acumulación de toxinas PSP en las caballas del Atlántico, *Scomber scombrus*. Los autores determinaron que estas son vectores letales para sus predadores porque retienen toxinas durante todo el año (STX [96 por ciento], GNTX2 y GNTX3 [4 por ciento]). También observaron que el contenido de toxinas en el hígado (determinado por CL) aumenta considerablemente con la edad del pez, lo que sugiere que la caballa las acumula progresivamente durante su vida. Asimismo, el contenido de toxinas en el hígado aumenta considerablemente durante el período de alimentación estival en el Golfo de St. Lawrence, en Canadá, y probablemente la fuente de las toxinas sea el zooplankton. El contenido promedio de toxinas es de 17,4 nmol por hígado y la toxicidad promedio de 112,4 µg eq de STX/100 g peso hígado en húmedo.

Sato *et al.* (2000) analizaron los tamboriles (*Arothron mappa*, *A. manillensis*, *A. nigropunctatus*, *A. hispidus*, *A. stellatus*, *A. reticularis*) de aguas de las Filipinas. Detectaron cantidades considerables de toxinas PSP (con STX como el componente dominante), además de tetrodotoxina (TTX), otra potente toxina marina que se encuentra en el pez de aleta. Las toxinas se encontraron en el hígado, intestinos, músculo y en la piel. Kungsuwan *et al.* (1997) detectaron toxinas PSP en los tamboriles de agua dulce (*Tetraodon leiurus complex*, *Tetraodon suvatii*) de una provincia al noreste de Tailandia. La toxicidad más alta se encontró en el hígado, con variaciones según el lugar y la estación de la captura. Los perfiles de toxinas obtenidos de las huevas, hígado, piel y músculo revelaron STX, neoSTX y dcSTX. Sato *et al.* (1997) identificaron la STX en el tamboril de agua dulce *Tetraodon fangi*, que causó intoxicación alimentaria en Tailandia, aunque no detectaron tetrodotoxina en esta especie. Las muestras de dos especies de tamboriles de agua dulce (*Tetraodon cutcutia*, *Chelonodon patoca*), provenientes de distintos sitios en Bangladesh fueron letales en el bioensayo en ratón (con entre 2,0 y 40,0 UR/g de tejido como PSP). Se determinó que, en general, la toxicidad de la piel es más alta que la de otros tejidos analizados (músculo, hígado, ovario). Los análisis de *T. cutcutia* revelaron STX, dcSTX, GNTX2 y GNTX3, dcGNTX2 y tres componentes no identificados relacionados probablemente a las PSP. Sin embargo, no se detectaron tetrodotoxinas ni otras sustancias relacionadas (Zaman *et al.*, 1997a).

2.5 Toxicidad de las toxinas PSP

2.5.1 Mecanismo de acción

La acción farmacológica de las toxinas PSP es muy similar a la de las TTX. Como los mecanismos de acción de la STX y de la TTX son casi idénticos se asumió que ambas moléculas tenían la misma interacción con el receptor. El mecanismo por el cual se bloquea el canal de sodio dependiente del voltaje ha sido objeto de varios estudios pues la STX y la TTX son los únicos agentes que lo bloquean selectivamente y con mucha afinidad.

El canal de sodio dependiente del voltaje es una proteína de aproximadamente 250 000 Da, que atraviesa la membrana plasmática de muchas células excitables. Esta caracterizada por una conducción uniforme, depende del potencial y presenta selectividad iónica. Esta proteína se encuentra en los nervios de los mamíferos, en las fibras del músculo esquelético y en la mayoría de las fibras del músculo cardíaco. Una vez que la célula se despolarizó correctamente, la conformación de la

molécula del canal de sodio cambia. Se abre un camino acuoso que permite el desplazamiento del ion Na^+ de la fase extracelular hacia el interior de la célula mediante ciertas fuerzas electroquímicas. El flujo de sodio hacia el interior causa un aumento de la fase del potencial de acción. Las membranas también presentan canales de sodio dependientes del voltaje que, cuando se abren, permiten el desplazamiento del K^+ intracelular hacia fuera con la consecuente repolarización. La STX y varias otras toxinas PSP bloquean el canal de sodio dependiente del voltaje con mucha potencia, enlenteciendo o anulando la propagación del potencial de acción, pero sin afectar el canal de potasio.

La función 7,8,9-guanidina participa en el bloqueo del canal. El C12-OH (como cetona hidratada) es importante y, si bien la cadena secundaria del carbamoilo contribuye, no es vital. Se determinó que los enlaces de hidrógeno entre la molécula de la toxina y el sitio de enlace contribuyen a la energía de enlace. Los investigadores concuerdan en lo que atañe a los aspectos cinéticos del enlace de la toxina. El tiempo promedio de bloqueo del canal depende de la velocidad de disociación y no de la concentración de toxinas. Sin embargo, la duración de la apertura del canal esta relacionada reversiblemente con la concentración de toxinas y depende de la constante de asociación (Mons *et al.*, 1998).

2.5.2 Farmacocinética

estudios con animales de laboratorio

ratas

Naseem (1996) estudió la cinética del saxitoxinol (STXOL), un análogo de la STX, marcado con [^3H] en ratas Wistar. El autor observó que luego de administrar una única dosis intravenosa de STXOL radiomarcado, este se distribuye rápidamente en los distintos tejidos, incluyendo el sistema nervioso central (SNC). Al cabo de dos horas excretaron en la orina el 40 por ciento de la dosis y el 80 por ciento luego de transcurridas 48 horas. La vida media ($t_{1/2}$) en plasma es de 29,3 minutos. El máximo de radioactividad en la mayoría de los tejidos, incluyendo el cerebro, ocurrió ocho horas después de la dosificación. Sin embargo, en el hígado y en el tracto gastrointestinal la radioactividad fue baja en la fase inicial siguiente a la dosificación con su punto más alto transcurridas 24 horas, lo que sugiere una ruta alternativa de eliminación y excreción. El STXOL se metabolizó en varios tejidos. Los porcentajes de actividad asociada a metabolitos no identificados luego de transcurridos diez minutos de la dosificación, son 19 por ciento en el extracto de riñón, 28,5 por ciento en los pulmones y 41,8 por ciento en el corazón. El 75 por ciento de la actividad registrada luego de transcurridas 48 horas se asoció a metabolitos no identificados. La menor biotransformación ocurrió en el músculo (14,4 por ciento) luego de 48 horas de la dosificación. En cuanto al SNC, los porcentajes de actividad asociada a metabolitos no identificados luego de diez minutos de la dosificación son 31,8 por ciento en el cerebro y el 37,4 en la médula. El 76 por ciento de la actividad observada en el cerebro luego de transcurridas 48 horas se asoció a metabolitos no identificados. En la orina no se detectaron metabolitos de STXOL.

Un estudio con ratas reveló que la STX radiomarcada de una dosis intravenosa subletal (aproximadamente 2 $\mu\text{g/kg}$) se excreta rápidamente por la orina. Pasadas cuatro horas de la administración, aproximadamente el 19 por ciento de la dosis de STX se excretó en la orina y aproximadamente el 58 por ciento luego de 24 horas. En todo el período de estudio, el promedio de excreción urinaria total de la STX administrada, fue de aproximadamente 68 por ciento. En ningún momento se detectó radioactividad en las heces. Los autores concluyeron que estos resultados prueban que en la orina de rata pueden detectarse pequeñas cantidades de STX no metabolizada hasta 144 horas luego de la administración intravenosa (Aune, 2001).

gatos

Andrinolo *et al.* (1999a) realizaron un estudio con 14 gatos machos (entre 2,5 y 5 kg de pc), que una vez anestesiados se conectaron permanentemente a un respirador artificial, luego se les inyectó una única dosis intravenosa de 2,7 o 10 μg STX/kg de pc. Durante las cuatro horas subsiguientes se registraron parámetros cardiovasculares, como tensión arterial y electrocardiogramas, y se tomaron

muestras de orina y sangre. Los animales se sacrificaron y se midió la concentración de STX en el cerebro, en el hígado, el bazo y en el bulbo raquídeo. Las dosis bajas no causaron cambios en los parámetros hemodinámicos. Las altas, por el contrario, causaron una reducción drástica de la tensión arterial, seguida de insuficiencia del miocardio y por último un paro cardíaco. La administración de dobutamina (2,5 µg/kg por minuto) restableció la hemodinámica y permitió a los gatos superar el shock. La excreción de la STX sólo se observó en la orina: en cuatro horas el 25 y el 10 por ciento de la dosis administrada a 2,7 y 10 µg/kg, respectivamente. La eliminación renal fue de 0,81 y 3,99 ml/min/kg con las dosis alta y baja, respectivamente. Los resultados obtenidos sugieren que la excreción de la STX se realiza principalmente por filtración glomerular. En la orina, en la sangre y en los tejidos analizados sólo detectaron STX y ninguna otra toxina PSP lo que indica que no hubo biotransformación. Sí detectaron STX en los órganos muy irrigados, como el hígado y el bazo, y también en el sistema nervioso central (en el cerebro [1,81 ng/g de tejido húmedo con la dosis alta] y en el bulbo raquídeo [2,5 ng/g de tejido húmedo con la dosis alta]), demostrando la capacidad de la STX de atravesar la barrera hematoencefálica.

observaciones en seres humanos

Los médicos clínicos observaron que si el paciente sobrevive a las PSP durante 24 horas, ya sea con o sin respiración artificial, cuenta con excelentes probabilidades de una recuperación rápida y completa. Esto indica que la o las toxinas que causan la intoxicación por PSP o se excretan rápidamente o se metabolizan, o ambas. Si bien la mayoría de las toxinas PSP tienen carga positiva, se absorben rápidamente a través de la mucosa gastrointestinal. Los síntomas varían según la gravedad de la intoxicación. Esta está determinada por la toxicidad específica de la toxina PSP ingerida, la cantidad de alimento ingerido y la velocidad de eliminación de la o las toxinas PSP del cuerpo. Según la cantidad de alimento tóxico ingerida, los primeros síntomas pueden ocurrir en un par de minutos (Mons *et al.*, 1998).

Gessner *et al.* (1997) estudiaron cuatro brotes de PSP en Alaska ocurridos entre mayo y junio de 1994. En los pacientes determinaron entre 2,8 y 47 nM y entre 65 y 372 nM de toxinas PSP en el suero y la orina, respectivamente, durante la intoxicación grave y luego de los síntomas agudos. También se observó hipertensión grave, aunque se detectaron solamente concentraciones nanomolares en el suero. Las diferencias en el perfil de las toxinas PSP de las muestras biológicas de seres humanos y de los mejillones indican que los primeros las metabolizan. Dentro de las 24 horas, la eliminación de las toxinas PSP del suero era evidente y se constató que la orina es la ruta de excreción principal. (Gessner *et al.*, 1997).

2.5.3 Toxicidad en animales de laboratorio

toxicidad aguda

La toxicidad de las PSP se expresa casi siempre como STX o como equivalentes de STX. Los compuestos sulfocarbamoil son bastante menos tóxicos que los otros grupos de toxinas PSP. Sin embargo, en condiciones ácidas pueden convertirse en carbamatos más tóxicos (Aune, 2001). Comparativamente con otras especies, como peces, anfibios, reptiles y animales de órdenes inferiores, el ratón es muy sensible a las toxinas PSP. El Cuadro 2.2 presenta los valores de DL₅₀ según la vía de administración. El Cuadro 2.3 presenta los valores de DL₅₀ para otras especies.

Cuadro 2.2 Toxicidad aguda de la STX en ratones (Mons *et al.*, 1998)

Vía	DL ₅₀ en µg/kg de pc
oral	260-263
intravenosa	2,4-3,4
intraperitoneal	9,0-11,6

Cuadro 2.3 DL50 oral de la STX en otras especies (Mons et al., 1998)

Vía oral	DL ₅₀ en µg/kg de pc
rata	192-212
mono	277-800
gato	254-280
conejo	181-200
perro	180-200
cobayo	128-135
paloma	91-100

Además de los bioensayos de letalidad en ratones para determinar la potencia relativa de todos los análogos en comparación con la de la STX (ver el Cuadro 2.4), sólo se estudió la acción biológica del 50 por ciento de los análogos naturales. Sin embargo, los resultados de los análogos estudiados muestran que los mecanismos celulares de acción son básicamente los mismos. Los N-sulfocarbamoil son bastante menos tóxicos que sus contrapartes de la serie del carbamoil pero en condiciones ácidas fácilmente se convierten en sus correspondientes compuestos de la serie carbamoil y, en algunos casos la toxicidad aumenta hasta 40 veces. Esta conversión es significativa del punto de vista clínico y de la salud pública, ya que ciertos mariscos poco tóxicos que contienen toxinas del N-sulfocarbamoil pueden causar intoxicaciones desproporcionadamente graves al ingerirlos. Sin embargo, experimentalmente se determinó que la conversión ocurre en jugos gástricos de ratón y de rata artificiales con un pH de 1,1; pero no en el jugo gástrico natural tamponado a un pH de 2,2 (Mons *et al.*, 1998).

Cuadro 2.4 Toxicidad relativa de las PSP en el bioensayo en ratón

Toxina	Toxicidad relativa
STX	1
neoSTX	0,5 – 1,1
GNTX _{2/3} ^a	0,39/1,09 – 0,48/0,76
GNTX _{1/4} ^a	0,8/0,33 – 0,9/0,9
dcSTX	0,43
dcneoSTX	0,43
B1	0,07 – 0,17
B2	0,07 – 0,09
C1 a C4	<0,01 – 0,14
dcGNTX1 a dcGNTX4	0,18 – 0,45

a = mezcla de epímeros α/β

Fuente: Usleber *et al.*, 1997

efectos tóxicos

Se estudiaron en animales los efectos de la STX en el sistema respiratorio, en el miocardio y en los tejidos musculares y nerviosos (tanto del sistema central como del periférico) (Mons *et al.*, 1998).

efectos en el sistema respiratorio

En la intoxicación con PSP, los efectos en el sistema respiratorio son la causa de la muerte. Esta ocurre por asfixia debido a una parálisis progresiva de los músculos respiratorios. En animales, una dosis entre 1 y 2 μg STX/kg de pc por vía intravenosa, reduce la actividad respiratoria, lo que se refleja como una disminución de la amplitud y de la velocidad. Un aumento de la dosis a 4 o 5 μg STX/kg de pc resulta en dificultades respiratorias serias. La muerte se previene mediante respiración artificial. Si la dosis no es excesiva puede ocurrir que la respiración se restablezca espontáneamente. En los experimentos con animales sólo se observó parálisis periférica por efectos directos en los músculos del sistema respiratorio. No se observa inhibición del centro respiratorio del sistema nervioso y los potenciales de acción se envían a los músculos del centro de las costillas y del diafragma. Sin embargo, otros investigadores sugieren una influencia central y no se puede descartar que haya efectos centrales en las neuronas respiratorias. A menudo, la parestesia y la sensación de liviandad están relacionadas con un efecto central, aunque también pueden ser ocasionados por efectos periféricos en el sistema nervioso (Mons *et al.*, 1998).

efectos cardiovasculares

Los estudios con animales anestesiados demostraron que dosis intravenosas de más de 1 μg STX/kg de pc pueden provocar hipotensión (con dosis menores se observa parálisis muscular). Rara vez se observan efectos cardiovasculares en intoxicaciones en seres humanos. Estos parecen ser más bien un reflejo de los efectos periféricos, aunque el sistema nervioso central pueda estar involucrado en cierta medida. La acción periférica es incierta. Además del efecto directo en los tejidos musculares, no se puede excluir la posibilidad de un bloqueo axonal del sistema nervioso simpático. La mayoría de los investigadores concuerdan en que no hay o casi no hay efectos cardíacos directos. Se menciona, a modo de excepción, una distorsión directa de la conducción del seno atrio-ventricular (Mons *et al.*, 1998).

efectos neuromusculares

Una dosis intravenosa entre 1 y 2 μg STX ocasiona un debilitamiento rápido de las contracciones musculares, tanto de aquellas por estimulación directa como por estimulación motoneuronal indirecta. Los efectos abarcan todos los tejidos musculoesqueléticos. Esta dosis induce también un decaimiento de la amplitud – potencial de acción y una extensión del período de latencia en el tejido nervioso periférico. La influencia afecta tanto a las neuronas motoras como a las sensoriales aunque, estas últimas se inhiben con dosis menores. La influencia en el sistema sensorial podría explicar la pérdida propioceptiva y el entumecimiento, pero no la parestesia. La teoría del mecanismo tóxico es objeto de numerosos debates científicos (Mons *et al.*, 1998).

efectos en el sistema nervioso central

No se ha determinado con certeza si las toxinas PSP tienen un efecto sobre el sistema nervioso central, aunque no se ha podido excluirlas. La mayoría de los síntomas pueden atribuirse a efectos periféricos. Algunos investigadores, por ejemplo, examinaron la influencia de la STX sobre el reflejo aquiliano (Mons *et al.*, 1998).

administraciones repetidas

No hay información.

mutegenicidad

No hay información.

estudios de reproducción /teratogenicidad

No hay información.

2.5.4 Toxicidad en seres humanos

toxicidad aguda

La concentración causante de las intoxicaciones por PSP en los seres humanos varía considerablemente. Esto se debe principalmente a diferencias de sensibilidad individuales y a oscilaciones del método de determinación. Se observaron síntomas leves con una ingesta oral entre 144 y 1 660 µg eq de STX/persona e intoxicaciones fatales por ingerir entre 456 y 12 400 µg eq de STX/persona, calculado a partir de los restos de mejillones tóxicos y considerando que estos valores pueden presentar grandes variaciones. En algunos casos, la ingesta oral de 300 µg de toxinas PSP por persona causó la muerte, mientras que en otros casos se observó la ausencia de síntomas tóxicos luego de una dosis oral de 320 µg de toxinas por persona. En Alaska, un pescador murió intoxicado con PSP mientras que otras dos personas lograron finalmente recuperarse. Se encontraron 370 µg de toxinas PSP (eq de STX)/100 g en los estómagos de los pacientes (Mons *et al.*, 1998). Según Aune (2001), otros autores mencionan intoxicaciones leves con dosis de toxinas PSP entre 304 y 4 128 µg/persona, e intoxicaciones graves con dosis entre 576 y 8 272 µg/persona (Aune, 2001).

En 1987 ocurrió un brote de PSP con 187 casos y 26 muertes por ingerir sopa de almeja (*Amphichaena kindermani*). Un 50 por ciento de los casos fatales fueron niños pequeños, en comparación con solo un 7 por ciento en adultos. Se estima que algunos de los niños que murieron habían ingerido aproximadamente entre 140 y 160 UR/kg de pc (Rodrigue *et al.*, 1990). Según Aune (2001), en este mismo incidente la dosis letal mínima fue de 25 µg eq de STX/kg para niños de 25 kg de peso, comparado con entre 86 y 788 µg eq de STX/kg de pc en cuatro de los adultos que murieron.

Según la Autoridad Alimentaria de Nueva Zelanda y Australia, en los seres humanos entre 120 y 180 µg de toxinas PSP pueden ocasionar síntomas leves, entre 400 y 1 060 µg pueden causar la muerte y dosis entre 2 000 y 10 000 µg muy probablemente sean fatales (ANZFA, 2001).

La tasa de mortalidad de las PSP es muy variable. En brotes recientes en América del Norte y Europa Occidental, con más de 200 personas afectadas, no se registró ninguna muerte. Sin embargo, la tasa de mortalidad de brotes similares en Asia Sudoriental y en América Latina es del 2 al 14 por ciento. Gran parte de la diferencia se debe a que los primeros ocurrieron principalmente en áreas urbanas, donde las víctimas cuentan con cuidados médicos. En Asia Sudoriental y en América Latina, por el contrario, las intoxicaciones ocurrieron a menudo en áreas rurales, donde los habitantes y médicos locales nunca habían observado este tipo de envenenamiento (Mons *et al.*, 1998).

síntomas tóxicos

En casos leves, los síntomas clínicos de intoxicación con PSP incluyen una sensación de hormigueo o entumecimiento alrededor de los labios que generalmente aparece dentro de los 30 minutos. Sin duda, esto se debe a la absorción local de las toxinas PSP por las mucosas bucales. Luego el hormigueo o entumecimiento se extiende progresivamente por el rostro y el cuello. Con frecuencia, el paciente experimenta una sensación de picazón en las puntas de los dedos de las manos y de los pies, cefaleas, mareos, náuseas, vómitos y diarrea y, ocasionalmente, también ceguera temporal. La mayoría de los síntomas aparecen rápidamente (en cuestión de horas), pueden durar varios días y son prácticamente invariables en todos los casos de intoxicación parálitica por mariscos. Estos síntomas preceden una debilidad muscular característica ya que los nervios sensoriales son más finos y tienen internodos más cortos que los nervios motores y son los primeros afectados por cualquier agente de bloqueo axonal.

En intoxicaciones moderadamente graves, la parestesia se extiende a los brazos y las piernas, que presentan también debilidad motriz. El paciente padece también vahídos y articulación incoherente. Con frecuencia se observan manifestaciones del cerebelo, como por ejemplo ataxia, falta de coordinación motora y dismetría. Las primeras dificultades respiratorias se manifiestan con una sensación de ahogo alrededor de la garganta. En casos de intoxicación grave, la parálisis muscular se extiende y se agrava. Generalmente, el pulso no presenta anormalidades alarmantes. En algunos casos, entre dos y 24 horas luego de la ingestión el paciente presenta dificultades respiratorias graves y muere por parálisis respiratoria (Mons *et al.*, 1998).

Las moléculas de STX tienen carga y son hidrosolubles. Por este motivo se cree que no atraviesan correctamente la barrera hematoencefálica y la mayoría de sus efectos ocurren en los nervios periféricos (Mons *et al.*, 1998). Gessner *et al.* (1997) observaron que los pacientes intoxicados por PSP en Alaska presentaron hipertensión en función de la dosis de toxinas ingerida.

efectos del consumo de alcohol

Aún no se sabe con certeza cuáles son los efectos del consumo de alcohol en la intoxicación por PSP. Algunos autores sostienen que el alcohol podría actuar como un agente protector contra los efectos adversos de las toxinas PSP, pero no se conoce aún el supuesto mecanismo mediante el cual reduciría el riesgo. Se sabe que la eliminación de las toxinas PSP se realiza, al menos parcialmente, por la orina y el alcohol podría actuar como un diurético. También podría causar la inducción de las enzimas hepáticas. En Alaska se efectuó un estudio de casos y testigos en 47 brotes con historial de consumo conocido para todos los individuos. El consumo de alcohol y la ingestión de mariscos preferentemente cocidos y no crudos se asociaron a un menor riesgo de PSP. No se pudo asociar la enfermedad ni con la concentración de toxinas ni con la dosis ingerida (Mons *et al.*, 1998).

tratamiento

El tratamiento clínico de las víctimas es integral. Si no hubo vómitos espontáneos, se procede con emesis inducida o con lavado gástrico para eliminar las fuentes de toxinas aún no absorbidas. En un medio ácido como el gástrico, las toxinas PSP tienen mucha carga y el carbón activado las absorbe eficazmente. Estos pasos son de suma importancia en el tratamiento de niños intoxicados ya que la gravedad de la intoxicación es directamente proporcional a la concentración de toxinas en el cuerpo. En Guatemala, en la epidemia de 1987 la tasa de mortalidad infantil (de hasta seis años) fue del 50 por ciento, mientras que en adultos solo de un 7 por ciento.

En casos moderadamente graves, el objetivo primordial es mantener respirando al paciente. En casos de intoxicación por PSP sin complicaciones, las vías respiratorias no se obstruyen con excreciones excesivas. La insuficiencia respiratoria se debe a distintos grados de parálisis de los nervios y músculos respiratorios por lo que se recomienda someter al paciente a respiración artificial con presión positiva, si corresponde. La acidosis que pudiera presentar el paciente se corrige con terapia de fluidos, que además facilita la excreción renal de toxinas.

Resulta eficaz el manejo integral, conservador y tradicional del paciente. Si el sobrevive 18 horas, la prognosis es buena y la recuperación total rápida. Algunos autores sostienen que en nueve horas se logra la disminución fisiológica de la concentración de toxinas hasta grados relativamente inofensivos, salvo en casos con concentraciones iniciales de toxinas muy elevadas o en víctimas con disfunción renal. Del punto de vista médico, las únicas medidas aceptables en casos de intoxicación con STX son la respiración artificial y el lavado gástrico. En casos de intoxicación grave, la respiración artificial no siempre es recomendable (Mons *et al.*, 1998).

Algunos estudios con animales indican que la 4-aminopiridina es un antídoto útil para intoxicaciones con STX. Chen *et al.* (1996) estudiaron ratas intoxicadas con STX y anestesiadas. Observaron que la sustancia revierte considerablemente la velocidad respiratoria, el volumen de respiración pulmonar y la tensión arterial a valores normales. También observaron que la 4-aminopiridina prolonga el tiempo de supervivencia y además disminuye la mortalidad en ratones (de 71 a 43 por ciento) con una dosis letal normal de STX (30 µg/kg intraperitoneal). Chang *et al.* (1997b) observaron que en cobayos, la sustancia revierte la falla cardiorespiratoria y los otros efectos letales de la STX. Los autores inyectaron 4-aminopiridina cuando la función cardiorrespiratoria está en peligro grave (a los 30 minutos de una inyección intramuscular de STX). En cuestión de minutos, el bloqueo del diafragma, la bradiopnea, la bradicardia y la disminución de la actividad cortical, fenómenos todos inducidos por la STX, se restablecen a grados comparables o superiores a los observados en el grupo testigo. La administración de las dosis de 4-aminopiridina indicadas para restablecer la función respiratoria y cardiovascular no provoca convulsiones ni ataques. Si provoca efectos secundarios menos pronunciados, como excitación cortical y períodos transitorios de fasciculación del músculo esquelético. Estos se consideran nimios en comparación con su notable efecto terapéutico.

Según Benton *et al.* (1998), en cobayos, la administración de 4-aminopiridina durante el paro respiratorio revierte la letalidad inducida por la STX. También observaron que facilita la recuperación y reduce el tiempo de dependencia de los cobayos en la respiración artificial.

2.5.5 Toxicidad en organismos acuáticos

Zhijun *et al.* (2001) estudiaron los efectos graves y crónicos de *A. tamarensis* en el camarón *Neomysis awatchensis*. Con 9 000 células por litro, la tasa de mortalidad de *N. awatschensis* es del 55 por ciento. La CL₅₀ de 96 horas para la misma especie de camarón es 7 000 células por litro. Con un filtrado sin células, el 25 por ciento de los camarones murió en 96 horas. En un experimento de 62 días, el 37 por ciento de *N. awatschensis* murió con una concentración de 900 células/ml y el número de juveniles fue 27 (solo 16,4 por ciento del número de juveniles en el grupo testigo). La primera fecha de reproducción se prolongó tres días en comparación con los grupos testigo. La longitud y el peso de los camarones progenitores con 900 células/ml es 95,6 y 81,8 por ciento, respectivamente, de los valores del grupo testigo. Las diferencias en longitud y peso no se consideran significativas.

Yan *et al.* (2001) estudiaron la inhibición del nacimiento de la vieira *Chlamys farreri* y la supervivencia de las larvas con distintas concentraciones de *A. tamarensis*. En huevos fértiles de vieira se registró solo un 30 por ciento de nacimientos y cinco por ciento en el grupo testigo con una exposición de 36 horas a células o fragmentos celulares de *A. tamarensis* en concentraciones de 100 y 500 células/ml, respectivamente. No se observó esta respuesta inhibitoria exponiendo los huevos a STX o a contenidos de células (células de algas suspendidas nuevamente o sobrenadantes). El alga también afectó a las larvas en el estadio D temprano de la vieira. Se observó un descenso considerable de las tasas de supervivencia con exposición durante seis días en concentraciones $\geq 3\,000$ células/ml. Ninguna larva sobrevivió a una exposición de 14 días en concentraciones de 10 000 células/ml. El estudio concluyó que los estadios de desarrollo previos a la blástula son los más sensibles a las toxinas de *A. tamarensis*. La comparación del efecto del alga sobre el nacimiento de los huevos según la fase de crecimiento muestra que el mayor efecto es en la fase de crecimiento exponencial temprana.

La mayoría de los mariscos bivalvos que se alimentan por filtración son relativamente insensibles a las toxinas PSP. Esto se debe a que muchos de ellos cuentan con nervios y músculos operados principalmente por canales de calcio activados por voltaje, en tanto que las STX y otras toxinas bloquean solo los canales de sodio con más potencia (con mucha afinidad). Esto permite a los mariscos continuar alimentándose y convertirse en muy tóxicos. El mejillón común, por ejemplo, puede acumular más de 80 μg STX en menos de una hora debido a su gran tolerancia y a que deja de alimentarse de algas tóxicas (Mons *et al.*, 1998).

Incluso existen ciertas especies de bivalvos que evitan los dinoflagelados tóxicos. Una de estas especies, de especial interés, es la chirla mercenaria, *Mercenaria mercenaria*. En estudios de laboratorio se observó que en presencia de *A. tamarensis*, primero retrae los sifones y luego se aísla por completo del ambiente exterior, cerrando la válvula de la concha. No vuelve a abrir sus válvulas hasta que se agrega agua de mar limpia (Mons *et al.*, 1998).

Las floraciones de *Alexandrium* pueden causar la muerte de peces. Para un arenque adulto, por ejemplo, una dosis entre 10 y 20 μg eq de STX es letal (Teegarden y Cembella, 1996). La observación con el microscopio óptico de pececillos de sabalote, *Chanos chanos*, expuestos (sin ventilación) durante un día a *A. minutum* tóxica ($1,4 \times 10^4$ células/ml $\sim 3,0 \times 10^4$ células/ml) o a extractos de algas tóxicas ($5,13 \times 10^3$ células/ml $\sim 2,05 \times 10^4$ células/ml) reveló edema notorio, hiperplasia y necrosis de las láminas secundarias de las branquias. En peces tratados con STX pura ($6,5 \times 10^{-2}$ $\mu\text{g}/\text{ml}$) se observaron síntomas similares. En pececillos sometidos al mismo tratamiento se observó un aumento de la tasa de consumo de O₂ y mayor demanda de presión de O₂ crítica. Los pececillos de sabalote tratados con células o extracto celular de algas *A. minutum* no tóxica no presentan daños en las branquias ni aumento de la velocidad de consumo de O₂ ni de la demanda de O₂ crítica. Sin embargo, se observó la muerte de los pececillos por sofoco en un período de 24 horas con

concentraciones de $2,1 \times 10^4$ células/ml de *A. minutum* no tóxica sin ventilación asistida (Chou y Chen, 2001b).

Samson *et al.* (1999) estudiaron los efectos subletales de *Alexandrium*, como los que pueden ocurrir antes y después de las proliferaciones, en un grupo de larvas de fúndulo, *Fundulus heteroclitus*, alimentado con copépodos que pastoreaban *Alexandrium*. Se observó que sistemáticamente las larvas expuestas presentan menor desempeño natatorio y capturan menos presas. En algunos ensayos se observó que los copépodos expuestos eran capturados más fácilmente que los no expuestos. Los resultados sugieren que *Alexandrium* afecta tanto a los peces como a sus presas, facilitando así el pasaje de las toxinas por la cadena alimentaria.

Las respuestas del zooplancton a los flagelados tóxicos son muy variables. Algunas especies evitan la ingestión del alga y otras seleccionan activamente. Bagøien *et al.* (1996) demostraron que *A. minutum* inactiva todos los estadios de desarrollo de *Euterpina acutifrons*, una especie del zooplancton, pero los efectos aparecen más rápido y son más intensos en los nauplios. Sin embargo, los nauplios y los copépodos que no presentan movimiento durante un cierto período de tiempo se definen a menudo como inactivos, aunque en muchos casos no están muertos. Por otra parte, en un estudio de gran volumen, de cinco días de duración, se observó que hacia el final del estudio la tasa de inactivación de los adultos era alta (el 80 por ciento estaba inactivado). Muchos de los copépodos están definitivamente muertos, pero un porcentaje considerable de las hembras adultas aún presentan actividad y son capaces de producir huevos viables. Tras cinco días de exposición a *A. minutum*, solo se detectaron trazas de toxinas PSP en los copépodos adultos lo que sugiere que el *E. acutifrons* evita ingerir los dinoflagelados luego de probar un par de células. La extrapolación de estos resultados a las condiciones naturales asumiendo que el zooplancton no evita la zona afectada, sugiere que, si bien ante una proliferación mediana o densa, los efectos tóxicos no son graves, en algunos casos muere un porcentaje considerable de la población zooplanctónica.

Dutz (1998) estudió los efectos de *A. lusitanicum*, un dinoflagelado productor de toxinas PSP, en la reproducción de *Acartia clausi*, un copépodo calonoide común. No se registró mortalidad de *Acartia clausi* alimentados con *A. lusitanicum* y continuaron siendo capaces de producir huevos, aunque en menor cantidad. Se cree que las toxinas ingeridas interfieren con el proceso digestivo o generan un gasto energético extra debido a la eliminación de toxinas, que resulta en una disminución de la disponibilidad energética y en menor fecundidad. En aguas costeras de Egipto la mortalidad de peces *in natura* y de peces en acuarios con agua de mar filtrada se asoció con floraciones densas de *A. minutum* (Bagøien *et al.*, 1996).

2.5.6 Toxicidad en aves acuáticas

Gochfeld y Burger (1998) describen el envenenamiento grave de pichones de gaviotas plateadas, *Larus argentatus*, que ingirieron un lote de vieiras adquirido en un comercio. Los pichones presentaron un síndrome grave característico, hasta ese momento no registrado en aves y cuya causa se desconoce. Los autores sugieren que fue causado por una variante de las toxinas PSP, ya que los síntomas incluían parálisis y hubo ingesta de mariscos. Sin embargo, los análisis realizados dieron resultados negativos para las STX, brevetoxina y ácido domoico.

2.6 Prevención de la intoxicación por PSP

2.6.1 Depuración

El objetivo de los métodos de eliminación de las toxinas paráliticas de los mariscos contaminados es reducir a un mínimo el tiempo durante el cual dichos mariscos no pueden comercializarse. El método más obvio es transferir los mariscos a aguas sin organismos tóxicos permitiendo que se autodepuren. Sin embargo, este método es costoso y requiere muchas horas de trabajo. Las tasas de eliminación de toxinas varían ampliamente según la especie permaneciendo tóxicas algunas de ellas incluso durante varios meses, como las *Crassostrea*, *Plactopecten* y *Spisula*, entre otras. En el mejillón, el tiempo

necesario para eliminar las toxinas también es variable. Si los dinoflagelados contaminantes desaparecen del agua, las toxinas disminuyen gradualmente. En 12 días, en agua salada sin dinoflagelados, a una temperatura entre 15 y 20° C, la toxicidad del mejillón, *Mitylus edulis*, disminuye en un 50 por ciento. En la almeja *Saxidomus giganteus*, el tiempo de eliminación de las toxinas PSP es más prolongado. Luego de la exposición a dinoflagelados tóxicos es necesario un año, o más, para que esta especie elimine las toxinas (Mons *et al.*, 1998). La tasa de eliminación varía según la estación y parece que temperatura del agua bajas retardan la eliminación. Sin embargo, aún no se sabe con exactitud en qué medida la temperatura del agua afecta la tasa de absorción y eliminación de toxinas. Esta, además, varía en función del lugar en el animal donde se alojaron las toxinas (las toxinas en el tracto gastrointestinal se eliminan más rápidamente que las toxinas alojadas en los tejidos) y de la concentración inicial o del pico de concentración de toxinas. Se sabe que los mejillones acumulan las toxinas PSP más rápido que otras especies de mariscos y que las eliminan rápidamente. En el caso de las ostras, si bien las toxinas no se acumulan tan rápidamente como en los mejillones, los tiempos de eliminación son considerablemente más prolongados (Mons *et al.*, 1998).

Los resultados de las técnicas de eliminación de toxinas con estrés de sal o temperatura han tenido escaso éxito. En vieiras, se acelera la excreción de toxinas con tratamientos de choque eléctrico instantáneo. En almejas amarillas, se intentó reducir el pH para eliminar las toxinas, pero no se obtuvieron buenos resultados. En Francia, se ensayó la cloración, pero el procedimiento altera el sabor del marisco disminuyendo el potencial de comercialización. Por otra parte, se determinó que el agua de mar tratada con ozono ayuda a eliminar las toxinas del marisco recién contaminado con dinoflagelados tóxicos en estado vegetativo. Un estudio realizado durante una marea roja demostró que el tratamiento del agua de mar con ozono impide la acumulación de toxinas PSP en los mariscos. Esta activación podría obtenerse en especies comerciales, como por ejemplo *Mya*, en tiempos económicamente viables. Sin embargo, el ozono es inútil cuando se trata de eliminar quistes o en bivalvos que han ingerido quistes o en los que las toxinas han estado alojadas en los tejidos durante largos períodos. Por otra parte, la eliminación de toxinas de los mariscos, especialmente de las paráliticas, por largos períodos, no es viable del punto de vista económico. El ozono no se recomienda como un método práctico ni seguro para eliminar las toxinas de los mariscos (Mons *et al.*, 1998).

La cocción es otro de los métodos propuestos para eliminar las toxinas PSP de los mariscos contaminados. Sin embargo, si bien reduce las concentraciones de toxinas, no elimina el peligro de intoxicación. En algunos casos, si la concentración inicial de toxinas es baja, la cocción constituye un método efectivo para reducir la toxicidad a un nivel seguro. El método de fritar en una sartén parece ser más efectivo que los otros métodos de cocción. Tanto en la cocción al vapor como por ebullición, las toxinas que se desprenden de los tejidos pasan al líquido de cocción que se vuelve extremadamente tóxico (Mons *et al.*, 1998). La ebullición de las ostras durante los tiempos de cocción habituales en el hogar (98 °C durante 10 minutos) reduce su toxicidad entre 68 y 81 por ciento. Sin embargo, la ebullición por sí sola no es suficiente para eliminar completamente las toxinas de los mariscos muy tóxicos (Jeong *et al.*, 1999).

Beringuer *et al.* (1993) estudiaron los efectos del proceso de enlatado industrial con berberechos, *Acanthocardia tuberculatum*, contaminados con toxinas PSP. Los autores observaron que la ebullición y la esterilización reducen la toxicidad, en promedio, en más de 70,6 y 77,9 por ciento y 81,8 y 90,9 por ciento, respectivamente. Takata *et al.* (1994) investigaron el tratamiento térmico como forma de reducir la toxicidad en ostras, *Crassostrea gigas*, contaminadas con PSP. La ebullición a 98 °C entre cinco y 60 minutos eliminó entre 53 y 88,3 por ciento de las toxinas. La esterilización en autoclave a 120 °C entre cinco y 60 minutos eliminó entre 57,4 y 100 por ciento de las toxinas. La ebullición y la esterilización en autoclave durante 60 minutos resultan en mayores porcentajes de eliminación de toxinas que en cinco minutos.

En ostras contaminadas con PSP la velocidad de eliminación de toxinas por ebullición y esterilización en autoclave es menor. En un grupo de ostras con 17,4 y 29,8 UR de toxinas PSP, sometidas a ebullición, enlatadas y esterilizadas en una autoclave, se observó una reducción de aproximadamente 20 por ciento posterior a la ebullición y de menos de 10 por ciento posterior a la esterilización en

autoclave. La toxicidad inicial determina la eficacia del enlatado como método para reducir la toxicidad por PSP a grados inferiores a los de cuarentena. El método requiere de suma precaución (Mons *et al.*, 1998).

Jeong *et al.* (1999) observaron una reducción $<80 \mu\text{g eq de STX}/100 \text{ g}$ posterior a la ebullición y enlatado ahumado de ostras, *Crassostrea gigas*, con entre 185 y 778 $\mu\text{g eq de STX}/100 \text{ g}$. Los porcentajes molares de los componentes de toxinas en las ostras sin caparazón son 25,1 por ciento de GNTX1 y 19,2; 17,2 y 14,6 por ciento molar de GNTX3, GNTX4 y GNTX2, respectivamente. Los autores observaron cantidades traza de C1, C2, STX y de neoSTX. En cuanto a la toxicidad específica, las toxinas dominantes son GNTX1-4. La suma de GNTX1, 2, 3 y 4 fue >80 por ciento de la toxicidad total. De las toxinas estudiadas, la STX y la dc-STX son las más termoestables.

El enlatado (coccción al vapor, coccción y esterilización) de mejillones, *Mitylus galloprovincialis*, encurtidos y en salmuera, causa una reducción del 50 por ciento de la toxicidad por PSP de la carne del marisco. Esta disminución no está relacionada con las concentraciones de toxinas en la carne de mejillón cruda. La reducción de la toxicidad total se debe a la destrucción de las toxinas y a que un cierto porcentaje se pierde en el agua de coccción y en los materiales de embalaje del producto enlatado. La conversión de toxinas cambia el perfil, que a su vez afecta los porcentajes de eliminación (Vieites *et al.*, 1999).

Indrasena y Gill (1999) estudiaron los efectos de un rango de valores de pH (entre 3 y 7) en la cinética de la destrucción térmica de cada toxina PSP en la glándula digestiva de la vieira. Los autores observaron que la mayoría de las toxinas individuales se degradan más rápidamente cuando se someten a temperaturas más elevadas, con un pH más alto durante períodos más prolongados. También observaron que la toxicidad por PSP a 130 °C, con un pH entre 6 y 7 disminuye rápidamente.

Indrasena y Gill (2000a) estudiaron mezclas de toxinas PSP purificadas y parcialmente purificadas, incluyendo toxinas C1/2 y B1, GNTX1-4, neoSTX y STX, que sometieron al calor (entre 90 y 130 °C), entre 10 y 120 minutos, con pH entre 3 y 7, y analizaron luego por CL. Los autores observaron que con pH bajo, las toxinas C disminuyen rápidamente y las GNTX1/4 disminuyen con temperaturas altas y pH alto. Con pH bajo, la GNTX 2/3 aumenta inicialmente y luego disminuye con el calor, mientras que con un pH entre 3 y 4, la STX aumenta uniformemente. La toxicidad total disminuye con un pH entre 6 y 7. La eficacia de la destrucción térmica está estrechamente relacionada con el pH, observándose una rápida destrucción térmica de las toxinas carbamato con pH alto. También se observó que con calor y pH bajo, los compuestos menos tóxicos se convierten en compuestos muy tóxicos.

Los mismos autores estudiaron la variación de las toxinas C (C1-2), GNTX1-4, STX y neoSTX en la glándula digestiva de la vieira y de una mezcla de toxinas PSP purificada almacenada a -35, 5 y 25 °C, con pH diferente (Indrasena y Gill 2000b). Todas las toxinas permanecen estables con pH bajo (entre 3 y 4) y a -35 °C. También observaron que a 5 y 25 °C, las toxinas C son las más sensibles a todos los cambios de pH, seguidas de las GNTX1/4. A -35 y 5 °C la más estable es la STX, seguida de la neoSTX, especialmente con un pH entre 3 y 4.

A excepción de los métodos mencionados por Berenguer *et al.* (1993) y Takata *et al.* (1994), casi no existen métodos útiles para reducir eficazmente el contenido de toxinas PSP en los mariscos contaminados. La mayoría de los métodos propuestos son poco seguros, demasiado lentos, inviables económicamente, o resultan en productos de aspecto o sabor inaceptables. Considerando el aumento de las floraciones de algas nocivas y el creciente interés en el cultivo de moluscos bivalvos en todo el mundo, es necesario continuar investigando medios eficaces para eliminar las toxinas de los mariscos contaminados con PSP. Si no se encontraran, sería necesario detectar las toxinas PSP controlando los mariscos.

Takatani *et al.* (2003) proponen tratar las ostras *Crassostrea gigas* contaminadas con toxinas PSP, con una solución alcalina y salina, para posteriormente someterlas al calor de microondas para descomponer eficazmente las toxinas.

No se detectó toxicidad en el músculo aductor en las vieiras *Patinopecten yessoensis*, vivas o frescas, contaminadas con PSP, con hasta 2 900 UR /g,. Por otra parte, la toxicidad del músculo aductor de las vieiras enteras congeladas es muy baja. La toxicidad varía según el procedimiento utilizado, especialmente con concentraciones elevadas cuando se dejan descongelar lentamente durante varias horas. El músculo aductor de la vieira *Patinopecten yessoensis* solo es apto para el consumo cuando se prepara a partir de vieiras vivas o frescas, luego de extraer cuidadosamente las vísceras tóxicas, las huevas y otros órganos (Murakami y Noguchi, 2003).

Se investiga en el marco del Programa de Investigación de la CE “Calidad de vida y recursos vivos”, un sistema de eliminación acelerada de toxinas para mariscos marinos vivos contaminados con toxinas PSP. El objetivo del proyecto es determinar los efectos de una dieta de microalgas para acelerar el proceso de eliminación de toxinas en ostras y almejas vivas, en un sistema capaz de sortear las dificultades que presenta la contaminación con PSP. El proceso está orientado a acelerar la cinética de la eliminación de toxinas del marisco con dietas adecuadas utilizando la densidad celular no tóxica (Anonymous, 1999a).

2.6.2 Medidas preventivas

Hasta el momento, los métodos para eliminar las toxinas de los mariscos en gran escala con sistemas artificiales, de manera económicamente viable y eficiente, no resultan prometedores. En las áreas propensas a brotes regulares de algas tóxicas, tanto los cultivadores como los pescadores comerciales utilizan sistemas de control que alertan de la presencia de mariscos tóxicos y planifican sus actividades en consecuencia. Una forma de limitar a un mínimo las pérdidas económicas es poner en práctica un programa de control intensivo y cultivar especies de “eliminación rápida” (por ejemplo *Mitylus edulis*) o de especies que se sabe evitan la ingestión de dinoflagelados tóxicos, por ejemplo *Mercenaria*, y la mayoría de las ostras y vieiras.

La inspección regular del agua en la que se cultivan los mariscos es una de las medidas preventivas para controlar la posible aparición de dinoflagelados tóxicos, particularmente durante la época de floraciones. Además, se recomienda controlar rutinariamente los mariscos para detectar la presencia de quistes de dinoflagelados. En consecuencia, es de suma importancia desarrollar un método rápido y confiable para detectar las especies de *Alexandrium* antes de una floración (Mons *et al.*, 1998). Una alternativa podría ser la identificación morfológica, pero no hay aún unanimidad al respecto (Sako, 1999). Algunas características morfológicas varían según las condiciones medioambientales o según el estadio de crecimiento. Por este motivo es necesario utilizar técnicas biológicas, bioquímicas, inmunológicas y de biología molecular. También se han utilizado análisis con anticuerpos monoclonales y ensayos de unión a la lecitina. Sin embargo, estas técnicas analíticas se basan en características fenotípicas que pueden verse afectadas por factores medioambientales (Adachi *et al.*, 1996). A fin de sortear los problemas fenotípicos, una herramienta útil será definir marcadores genéticos para clasificar las especies de *Alexandrium* productoras de toxinas PSP. Algunos autores investigaron las secuencias del ADN ribosómico (ADNr) y los espaciadores transcritos internos (ITS por sus siglas en inglés), con sondas de ADN e hibridación de toda la célula (Adachi *et al.*, 1996; Sako, 1999).

Haley *et al.* (1999) simplificaron un método para trabajar con un protocolo que insume mucho tiempo y gran cantidad de recursos, para aislar el ADN ribosómico (ADNr) de *A. tamarensis*. El método detecta 10^{-4} ng/ μ l de ADN de *A. tamarensis*. El equipo permite aislar *A. tamarensis* a partir de fuentes de agua con muy poca degradación de la señal. Es una técnica útil que permite detectar rápidamente la presencia de *A. tamarensis*, incluso antes que la cantidad de células sea suficiente para su identificación morfológica.

Guzmán *et al.* (2001) proponen fortalecer la prevención utilizando, además de un programa de control de PSP, un programa de formación de grupos objetivo específicos y mediante un sistema de disseminación de la información adecuado. Un programa utilizado en el sur de Chile en 1997 incluyó:

- talleres de formación para distintos grupos;
- preparación y divulgación de información clave sobre floraciones de algas nocivas y sus efectos, destinada a la comunidad en general; y
- actividades específicas con alumnos, maestros y personal docente de escuelas primarias y secundarias.

Es necesario adoptar las medidas correspondientes para impedir el consumo de mariscos contaminados e informar a las autoridades sanitarias de los casos de intoxicaciones por PSP en los seres humanos tan pronto como sea posible. El Capítulo 2.8 trata del control y la reglamentación vigente.

2.7 Casos y brotes de PSP

2.7.1 Introducción

Hallegraeff (1993) menciona el aumento de la distribución global de la intoxicación paralítica por mariscos. Hasta 1970, sólo se tenía conocimiento de floraciones de dos especies de dinoflagelados productoras de PSP, *A. tamarensis* y *A. catenella*, en aguas templadas de Europa, América del Norte y Japón. Veinte años más tarde se registraban todo a lo largo del hemisferio sur: en Sudáfrica, Australia, India, Tailandia, Brunei Darussalam, Sabah (Malasia), las Filipinas y en Papua Nueva Guinea. El interés creciente en la explotación acuícola de aguas costeras fomentó indudablemente un mayor conocimiento de las especies de algas tóxicas, pero aún no se sabe a ciencia cierta si esta es la única explicación.

2.7.2 Europa

La Figura 2.2 ilustra la presencia de toxinas PSP en aguas costeras de países europeos miembro del CIEM, desde 1991 a 2000.

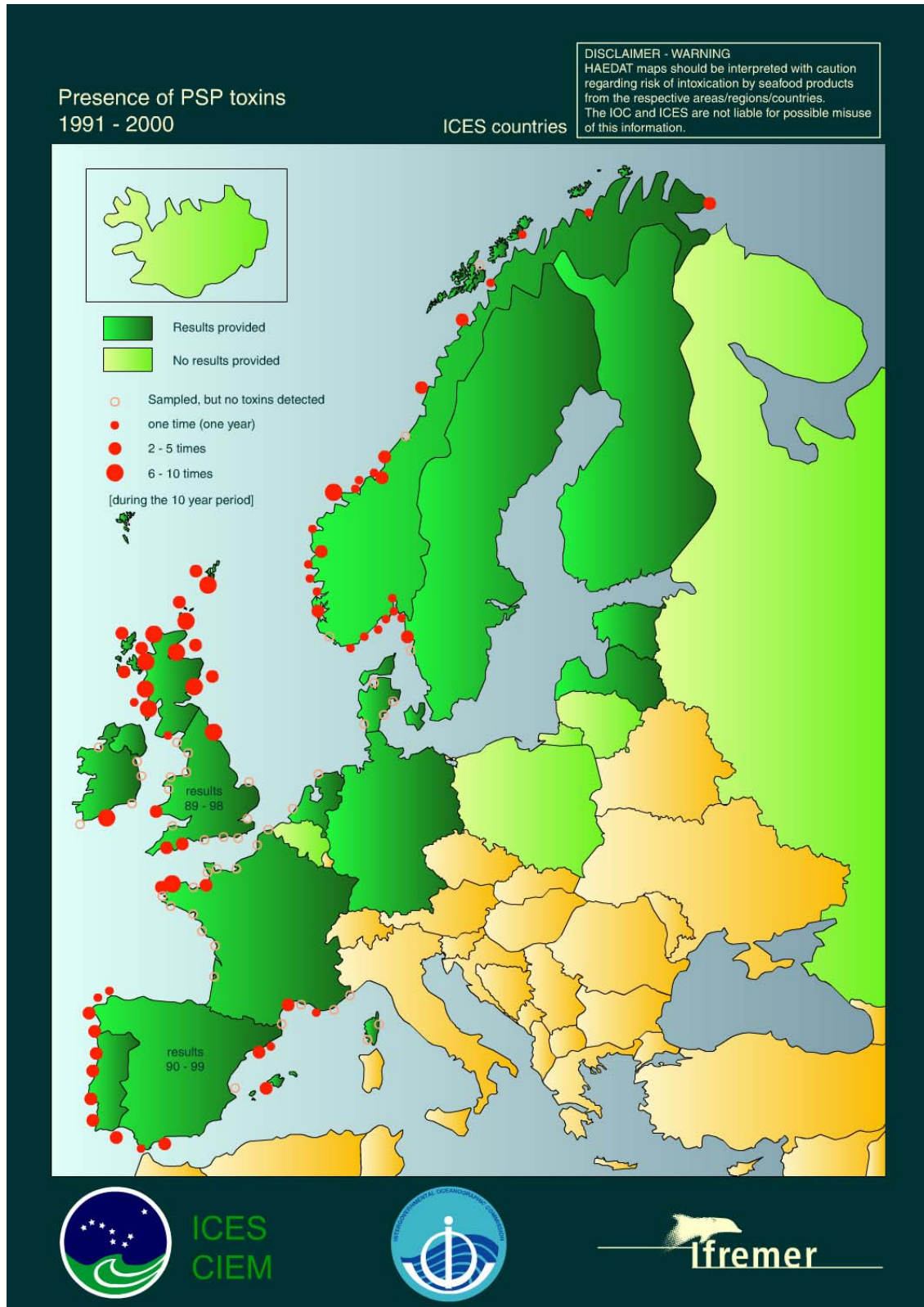
Dinamarca

En 1987 y en 1990 (y probablemente también en 1988) se detectó la presencia de toxinas PSP producidas por las especies *A. tamarensis* y *A. ostentfeldii*, en mejillones de la costa este de Jutlandia. (CRL, 1995). En 1996 se registró otro episodio de PSP, seguido de otro episodio tipo PSP en 1997, aunque en este último caso no se confirmó la existencia de toxinas PSP (EU-NRL, 1998).

Francia

La mayoría de los episodios tóxicos causados por biotoxinas marinas se asociaron con ficotoxinas diarreicas y sólo algunos menos significativos con ficotoxinas paralíticas. Todos ellos ocurrieron en la costa norte de Bretaña y en todos los casos fueron causados por *A. minutum*, con una toxicidad máxima de 400 µg eq de STX/100 g de carne en ostras y mejillones. A fines de 1992 se detectó la presencia de toxinas PSP en mejillones de la costa Atlántica sin que se encontraran algas productoras de toxinas en las aguas (CRL, 1995). A fines de 1998 se observaron concentraciones de hasta 350 000 células de *A. tamarensis* por litro y algunas zonas de cultivo de almejas, ostras y mariscos permanecieron cerradas durante dos meses (EU-NRL, 2000). En 2000 se cerraron dos zonas de cultivo en Bretaña debido a la presencia de toxinas PSP (EU-NRL, 2001).

Figura 2.2 Presencia de toxinas PSP en aguas costeras de los países europeos miembro del CIEM desde 1991 a 2000



Fuente: <http://www.ifremer.fr/envlit/documentation/dossiers/ciem/aindex.htm>

Alemania

Desde principios del siglo veinte no se han registrado intoxicaciones asociadas a PSP debidas al consumo de mejillones recogidos en aguas alemanas. Sin embargo, desde 1972, cuando se registraron intoxicaciones en Alemania por consumir mejillones españoles contaminados, éstos se controlan regularmente. Se ha detectado la presencia, aunque limitada en número, de organismos causantes como *A. tamarensis*, *A. minutum* y *A. ostenfeldii*. En 1987 ocurrieron tres casos de PSP en Baja Sajonia los que, una vez más, podrían atribuirse al consumo de mejillones enlatados provenientes de España (CRL, 1995). Desde marzo de 1992 se ha observado la presencia de quistes viables de especies idénticas o muy similares a *G. catenatum* en la costa del Mar del Norte y del Mar Báltico, pero aún no se ha determinado la toxicidad de la cepa. También se han aislado algas verde-azuladas productoras de PSP en agua dulce. No se ha informado de la existencia en aguas alemanas de otras especies productoras de toxinas PSP (IOC, 1995).

Irlanda

En julio de 1992 se observó en el Puerto de Cork, un evento de PSP asociado a *Alexandrium tamarensis*, de tan solo una semana de duración (CRL, 1995). En junio de 1996 se detectó en el mismo puerto la presencia de GNTX2 y GNTX3 en mejillones no cultivados, *Mytilus edulis*, y en ostras de cultivo, *Crassostrea gigas*, luego de una floración de *A. tamarensis*, con concentraciones máximas determinadas por CL de 360 y 88 µg eq de STX/100 g de carne, respectivamente. En 12 días se observó que en *M. edulis* las concentraciones (determinadas por CL) disminuyeron a 25 µg/100 g de carne por depuración natural; mientras que en *C. gigas* disminuyeron a 3 µg eq de STX/100 g de carne en una unidad de depuración (Furey *et al.*, 1998). En 1999 se detectaron quistes de *A. tamarensis* en los sedimentos superficiales del Puerto de Cork, a partir de los cuales se han obtenido cultivos viables (EU-NRL, 2000). En julio de 2002, en el mismo puerto y durante un período de tres semanas, se detectaron concentraciones de toxinas PSP superiores al límite reglamentario, tanto en ostras como en mejillones (EU-NRL, 2002).

Italia

En el Mar Adriático las mareas rojas son un fenómeno recurrente, pero, a pesar de la presencia de especies potencialmente tóxicas como *Alexandrium* spp., hasta 1995 no se registraron casos de intoxicación con PSP en humanos. Entre abril y julio de 1994, 1995 y 1996 se detectó la presencia de *A. minutum* en las estaciones de muestreo de Emilia Romagna, a lo largo de la costa noroeste del Adriático. En mayo de 1994 se detectaron algunas muestras de mejillones con concentraciones de toxinas PSP superiores a 80 µg eq de STX./100 g de carne, pero no se presentaron problemas de salud pública (Poletti *et al.*, 1998). En la costa de Emilia Romagna también se encontraron muestras de mariscos contaminadas con toxinas PSP a causa de la presencia de *A. minutum* en el agua del mar (CRL, 1995). En abril y mayo de 2001 se detectaron concentraciones de toxinas PSP <40 µg eq de STX/100 g de carne, asociadas a *A. minutum* en Friuli Venecia Giulia (EU-NRL, 2001). Casi un año más tarde, a fines de mayo y principios de junio de 2002, en Cerdeña (Golfo de Olbia), se detectó la presencia de toxinas PSP, asociadas a las especies *A. catenella* y *A. minutum*, en concentraciones superiores a 80 µg eq de STX/100 g y un máximo de 2 510 µg eq de STX/100 g (EU-NRL, 2002).

Países Bajos

Rara vez se ha observado la presencia de algas productoras de PSP. Si bien en 1989 se identificaron especies de *Alexandrium* en el Mar del Norte, no se encontraron moluscos con toxinas PSP. En 1990 se registraron algunos casos de personas con síntomas de parálisis luego de ingerir mariscos provenientes del mar de Wadden, pero se determinó que estos casos no estaban relacionados con PSP (Mons *et al.*, 1998). En una ocasión se detectó la presencia de toxinas PSP en vieiras pero resultaron ser una captura incidental del Mar del Norte (CRL, 1995).

Noruega

Los eventos de contaminación con toxinas PSP en Noruega se encuentran entre los primeros registrados en Europa. Las toxinas se han detectado frecuentemente y en varias localidades con casos de intoxicación humana en siete oportunidades (en 1901, 1939, 1959, 1979, 1981, 1991 y 1992) con

un total de 32 víctimas, incluidos dos casos fatales (Mons *et al.*, 1998). En 1994 se puso en práctica un programa de vigilancia que resultó en el cierre de varias zonas de producción debido a la presencia de PSP y en años subsiguientes se observó un patrón similar (EU-NRL, 1998). El 11 por ciento de las muestras analizadas en 1999 contenía toxinas PSP y se informa de algunos casos de enfermedad en humanos asociada a mejillones importados de Suecia (EU-NRL, 2000).

Portugal

Entre 1986 y 1990 se produjeron brotes de PSP en la costa al norte del Cabo Roca. En 1991 no hubo brotes, pero en 1992 volvieron a producirse en la misma zona, en la costa sur de Lisboa y a lo largo de la costa del Algarve, en concentraciones entre 100 y 500 µg eq de STX/100 g de marisco. En 1993 se detectó la presencia de toxinas PSP asociadas principalmente a *Gymnodinium catenatum*, durante prácticamente todo el año y en toda la costa, con concentraciones entre 113 µg eq de STX/100 g de marisco en la costa norte en diciembre, y 9 145 µg eq de STX/100 g en la costa de Lisboa en setiembre. En 1994 se registraron brotes en la costa del Algarve y del sur de Portugal y se determinó que *Gymnodinium catenatum* fue el principal organismo causante. En la Laguna de Obidos se determinó que uno de los organismos causantes de los brotes de PSP fue *Alexandrium lusitanicum* (IOC, 1995). En las últimas dos semanas de octubre de 1994, nueve personas (seis mujeres y tres hombres) se intoxicaron con PSP por ingerir moluscos, *Mytilus edulis*, provenientes de la costa oeste de Portugal (De Carvalho *et al.*, 1998). En 1997 sólo se detectó la presencia de toxinas PSP en una especie: *Tellina crasa* (EU-NRL, 1998). En el área de Algarve se observó la presencia de *G. catenatum* en concentraciones superiores a 3000 células por litro y se estableció un cierre preventivo (EU-NRL, 2000).

España

Desde 1976, la región de las rías de Galicia en el noroeste de la costa atlántica española, donde el cultivo de mejillones es una industria importante, se ha visto seriamente afectada por incidentes de PSP. Los mejillones españoles contaminados causaron intoxicación alimentaria, tanto en España, como en los países que los importaron. En países de Europa Occidental como Alemania, Francia, Suiza e Italia hubo un total de 120 personas afectadas en 1976, aunque sin casos fatales, por ingerir mejillones contaminados, *Mytilus edulis*, importados de España (IPCS, 1984).

Gago-Martinez *et al.* (1996) describen otro episodio muy grave ocurrido en 1993, con eventos tóxicos que se extendieron durante períodos inusualmente largos y que causaron muchos casos en humanos con síntomas poco habituales. Los autores indican que probablemente el organismo causante fue el dinoflagelado *A. catenatum* y señalan la complejidad del perfil de las muestras de mejillones obtenido por análisis químico. El perfil contenía tanto DSP como PSP y entre estas últimas detectaron B1 y derivados decarbamoilados de STX, GNTX2 y de GNTX3, así como pequeñas cantidades de STX y de otras toxinas PSP (no identificadas). En 1995 y 1997 se registraron episodios esporádicos de dos o tres semanas de duración en Galicia (EU-NRL, 1998). En 2000 ocurrieron eventos tóxicos asociados a toxinas PSP que resultaron en la prohibición de cosechar bivalvos en ciertas zonas de cultivo (EU-NRL, 2001).

En enero de 1989 se observó un aumento de las concentraciones de PSP en las escupiñas, *Venus verrucosa*, un bivalvo de la costa mediterránea del sur de España. El aumento, que se constató por medio de análisis rutinarios, probablemente estuvo asociado a la alta concentración de células desnudas del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum*, encontradas en muestras de agua de mar. Las autoridades sanitarias regionales decidieron establecer una veda para la recolección y venta de mariscos en razón de las concentraciones superiores a 80 µg eq de STX/100 g de carne detectadas en otras especies de moluscos (*Venus verrucosa*, *Venerupis rhomboides*, *Callista chione*, *Acanthocardia tuberculatum*) provenientes de las áreas afectadas. El incidente afectó la costa mediterránea de España entre Málaga y Algeciras, una extensión de 150 kilómetros aproximadamente, y probablemente llegó hasta la costa de Marruecos explicando la toxicidad en *A. tuberculatum* importadas de Marruecos en febrero de 1989 (Mons *et al.*, 1998).

En los meses de abril y mayo de 1995, una floración del dinoflagelado *Alexandrium minutum* con concentraciones máximas de 45×10^6 células por litro tiñó las aguas del puerto de Palma de Mallorca (Islas Baleares) de un color marrón rojizo poco habitual. Las muestras de poblaciones no cultivadas de moluscos bivalvos (*Mytilus galloprovincialis*, *Chamelea gallina* y *Lithopaga lithopaga*), analizadas por bioensayo en ratón dieron resultados positivos, con un máximo de 1170 eq de STX/100 g de tejido. En abril de 1996 y en febrero de 1997 se observaron en esa misma área del puerto mareas rojas de diez días y tres semanas de duración, respectivamente (Forteza *et al.*, 1998).

Tahri Joutei (1998) menciona un brote de PSP observado en octubre y noviembre de 1994 en las costas atlánticas de España, luego de una floración de *G. catenatum*. En 2002, en Galicia (noroeste de España) *A. minutum* y *A. catenella* provocaron eventos tóxicos de corta duración. En Andalucía, la presencia de *G. catenatum* determinó el cierre de ciertas zonas de cultivo, especialmente de *Acanthocardia tuberculata* y de vieiras (EU-NRL, 2002).

Suecia

La contaminación de las zonas de cultivo de mejillones ocurre a finales de la primavera y principios de verano. Entre 1985 y 1988 se detectó la presencia de toxinas PSP en moluscos. En 1986 y 1987 el máximo de toxicidad registrado fue de 1 000 UR/100 g de carne en la especie *A. excavatum* (Mons *et al.*, 1998). El análisis de las muestras por bioensayo se realizó en Noruega y se detectaron concentraciones altas en mayo de 1997 (de aproximadamente 300 µg eq de STX/100 g) (EU-NRL, 1998).

Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte

Los primeros casos de intoxicación con PSP ocurrieron en 1968 por ingerir mejillones locales (*Mytilus edulis*) provenientes de la costa noreste de Inglaterra, con entre 600 y 6 000 µg eq de STX/kg, con 78 personas hospitalizadas, pero sin casos fatales (IPCS, 1984). Desde ese entonces, solamente en 1972 y 1973 se ha detectado frecuentemente PSP con concentraciones inferiores a 400 UR/100 g de marisco. En 1977, la toxicidad alcanzó 1 792 UR/100 g. Todos los años entre 1978 y 1981, se observaron eventos de PSP en la costa noreste hacia Escocia, pero la red de control previno eficazmente la intoxicación en humanos. En 1990 se registraron los primeros casos de PSP a lo largo de la costa oeste de Escocia, con concentraciones de toxinas máximas en el orden de 16 480 UR/100 g en mejillones y vieiras (Mons *et al.*, 1993).

En 2000 y 2001 se detectaron concentraciones de toxinas PSP bajas en algunas zonas de Inglaterra y Gales (EU-NRL, 2001). A principios de mayo de 2000 y 2001 se detectaron en Escocia toxinas PSP en mejillones de zonas de cultivo situadas a lo largo de la costa oeste y en el tejido de gónadas de vieiras provenientes de zonas de las Orcadas. A mediados de mayo, las concentraciones en tejido de vieiras alcanzaron 158 µg eq de STX/100 g y se impusieron restricciones al cultivo y recolección de estos moluscos. A fines de mayo se constató que las áreas de cultivo en las Islas Shetland y las áreas de cultivo de vieiras en la costa este estaban también afectadas. En mejillones provenientes de las Islas Shetland se detectaron concentraciones de 211 µg eq de STX/100 g, de 2 999 µg eq de STX/100 g en las Orcadas y de 220 µg eq de STX/100 g en la costa oeste y se impusieron restricciones a la recolección del molusco en ciertas zonas de cultivo. Hacia mediados de julio ya no se detectaron toxinas en mejillones, pero aun a mediados de octubre las vieiras y el tejido de gónadas de vieiras presentaban toxinas. En algunas zonas, las concentraciones en tejidos de vieiras superaban los 80 µg eq de STX/100 g, por lo que se mantuvieron las restricciones impuestas (EU-NRL, 2001).

En el período comprendido entre el 1 de abril de 2002 y el 31 de marzo de 2003 se recolectaron y analizaron 5 409 muestras de mariscos provenientes de 76 zonas costeras de producción primaria y de 36 zonas de pesca secundarias en mar abierto de Escocia. De las muestras recolectadas, 1 690 se analizaron para detectar la presencia de PSP y 21 de ellas dieron resultados positivos (Anonymous, 2003c). En agosto de 2001, luego de que se detectaran toxinas PSP en vieiras, el Organismo de Normas Alimentarias del Reino Unido decretó una veda para la recolección de este molusco en los mares de Irlanda del Norte (Anonymous, 2001a).

2.7.3 África

Marruecos

La presencia de *G. catenatum* se detecta ocasionalmente entre fines de verano y principios de otoño en aguas marroquíes del Atlántico. En octubre y noviembre de 1994 se registró la floración más notable asociada a un brote de PSP, que también se observó en las costas españolas del Atlántico en setiembre de 1994 y en las portuguesas en octubre del mismo año (Tahri Joutei, 1998). Entre 1994 y 1996 se analizaron moluscos bivalvos para detectar la presencia de toxinas PSP, y en noviembre de 1994 se detectaron concentraciones máximas de aproximadamente 6 000 µg eq de STX/100 g de carne en *Mytilus galloprovincialis* en la costa atlántica (Taleb *et al.*, 1998).

En la especie *A. tuberculatum* se encontraron concentraciones de toxinas PSP altas (hasta aproximadamente 800 µg eq de STX/100 g de carne) todos los años en los que se realizaron controles en la costa mediterránea. Pero, en otras especies, como por ejemplo *Venus verrucosa*, *Callista chiona* y *Donax trunculus* de la misma zona, la contaminación fue solo temporaria, en general entre enero y marzo de 1995, y las concentraciones de PSP nunca superaron los 250 µg eq de STX/100 g carne (Taleb *et al.*, 1998).

Sudáfrica

En 1969 y en 1979 se registraron respectivamente 6 y 17 casos de intoxicación con PSP, (dos de ellos fatales), por ingerir mejillones, *Chloromytilus meridionalis*, con hasta 84 000 µg eq de STX/kg (IPCS, 1984). La presencia de *Gonyaulax catenella* se detecta regularmente en la costa oeste del país y ha causado la muerte de varios seres humanos (Collins, 2001).

En marzo de 1994 se detectó *A. tamarensis* en una floración y las muestras de mejillones y ostras analizadas revelaron toxinas PSP con concentraciones superiores al límite de seguridad de toxicidad (Anonymous, 2003a). En abril de 1999, Pitcher *et al.* (2001) detectaron toxinas PSP en abalones de cultivo, *Haliotis midae*, en dos zonas de cultivo en la costa oeste y en especímenes no cultivados de la misma región. Los resultados del bioensayo en ratón de la AOAC fueron desde concentraciones no detectables hasta 1 609 µg eq de STX/100 g y se cree que el organismo causante fue *A. catenella*.

Túnez

En las lagunas de Burger y Gar el Melh se encontraron más de 700 toneladas de peces muertos: róbalo y besugos de criadero y varias especies de peces no cultivados. La muerte se atribuyó a la presencia de las especies *Alexandrium minutum* y *A. tamarensis*, productoras de toxinas PSP y de *Girodinium aureolum*, productora de una sustancia hemolítica (Rhomdane *et al.*, 1998).

2.7.4 América del Norte

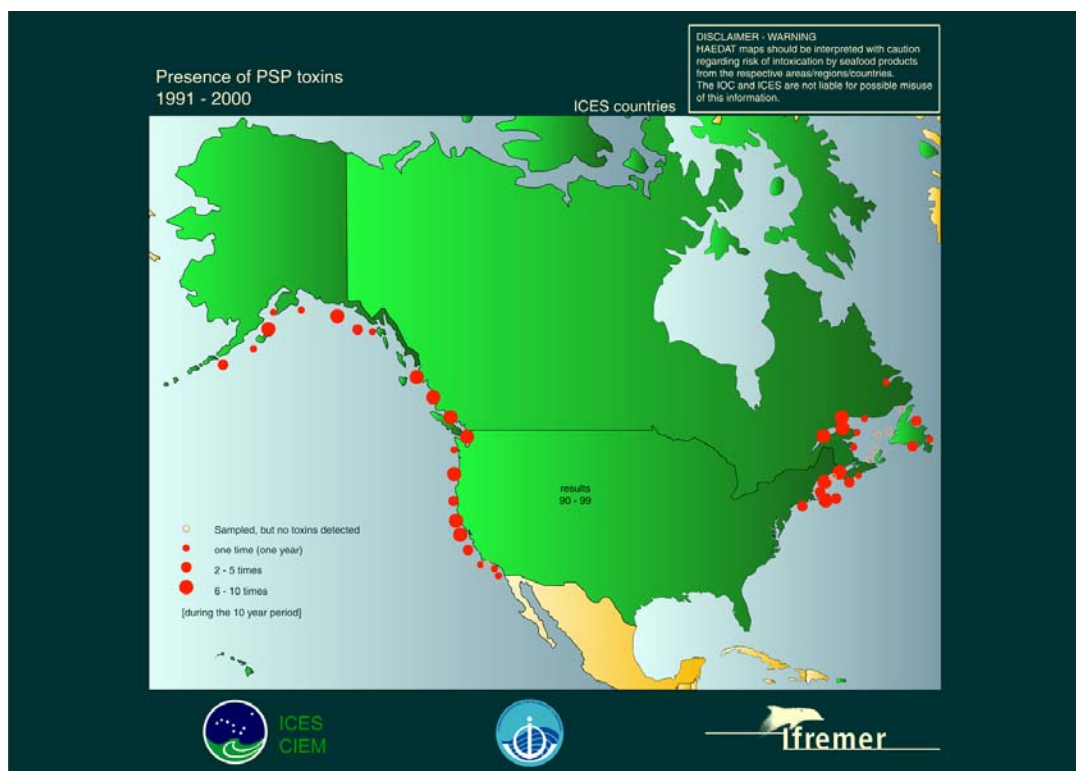
La Figura 2.3. ilustra la presencia de toxinas PSP en aguas costeras de países norteamericanos miembro del CIEM desde 1991 a 2000.

Canadá

El primer informe de presencia de toxinas PSP es de 1793 en la Columbia Británica, cuando cuatro tripulantes de la expedición de Vancouver enfermaron y uno de ellos murió al poco tiempo de consumir mariscos recogidos en las costas de esta provincia. Existen registros de la presencia de toxinas PSP en el Estuario Saint Lawrence (Québec) y en la Bahía de Fundy (entre Nueva Brunswick y Nueva Escocia) desde la década de 1880 (Todd, 1997). En 1978 y en 1982 se registraron dos y cinco casos de intoxicación con PSP, respectivamente, luego de ingerir mejillones o almejas locales con 430 000 y 21 000 µg eq de STX/kg, respectivamente, con un caso fatal (IPCS, 1984). Entre 1880 y 1995 se documentaron 106 incidentes de PSP con 538 casos y 32 muertes. La mayor cantidad de casos ocurrió entre el 30 de abril y el 18 de agosto de 1974 en el Estuario Saint Lawrence, con concentraciones de toxinas de hasta 4 900 µg/100 g y 43 casos. En la costa oeste, la almeja amarilla, *Saxidomus giganteus*, puede permanecer tóxica durante todo el año (Todd, 1997). En mayo de 1999,

dos empleados de un criadero de salmones en el Canal Herbert, en Columbia Británica, presentaron síntomas de intoxicación con PSP luego de ingerir vieiras no cultivadas en el área de producción (Anonymous, 1999b).

Figura 2.3 Presencia de toxinas PSP en aguas costeras de países norteamericanos miembro del CIEM desde 1991 a 2000



Fuente: <http://www.ifremer.fr/envlit/documentation/dossiers/ciem/aindex.htm>

Estados Unidos de América

La costa este

Los primeros registros de casos de intoxicación con PSP en la región de Nueva Inglaterra datan de 1958 en las zonas más al este de Maine, próximas a la frontera con Canadá. En 1972, una marea roja de *A. tamarensis* se extendió desde el sur de Maine, a lo largo de New Hampshire y hasta Massachussets, ocasionando por primera vez toxicidad en mariscos en la zona sur, con 33 personas afectadas pero sin casos fatales. Antes de 1972 se detectaron ocasionalmente toxicidades bajas en el sur de Maine, al oeste de la Bahía de Penobscot; pero actualmente los brotes en la zona son mucho más numerosos y tóxicos. Desde 1972, casi todos los años se producen brotes de PSP en Maine, New Hampshire y Massachussets ya que una vez que una floración masiva introdujo los quistes de *Alexandrium*, estos permanecen en el agua. En 1979, la detección de PSP condujo al cierre de algunos bancos de mejillones en la Bahía de Narragansett, Rhode Island, pero nunca se identificó el organismo causante. En años subsiguientes se detectaron células y quistes de *A. tamarensis*, así como también toxicidad por PSP en pequeños embalses en Connecticut y en Long Island. Incluso se han detectado células móviles y quistes de *A. tamarensis* muy al sur, en Nueva Jersey, aunque nunca toxicidad. Los datos de los últimos años indican que en las últimas décadas, las especies tóxicas de *Alexandrium* del noreste de Estados Unidos se dispersan gradualmente hacia el sur. Esta hipótesis explica la floración de 1972, aunque, por otro lado, parte del fenómeno puede atribuirse a la detección de poblaciones autóctonas de baja toxicidad en aguas sureñas (Anderson, 1997). En 1980 se registraron 51 casos de

PSP por ingerir mejillones y ostras locales con entre 3 000 y 40 000 µg eq de STX/kg, pero sin casos fatales (IPCS, 1984).

En Junio de 1990, el Ministerio de Salud Pública de Massachussets tomó conocimiento de seis pescadores embarcados en la zona del George's Bank, en la costa de Nantucket, que padecían una enfermedad transmitida por los alimentos. Los síntomas comenzaron luego de ingerir mejillones comunes cocidos, *Mytilus edulis*, recolectados en aguas profundas, aproximadamente a 115 millas de la isla de Nantucket, con concentraciones de 244 000 y 4 280 µg eq de STX/g en mejillones crudos y cocidos, respectivamente (Anonymous, 1991).

En Connecticut, Long Island (Nueva York) y Nueva Jersey, zonas que parecerían definir el extremo sur de la distribución geográfica del organismo, se detectaron ocasionalmente concentraciones de toxinas PSP (o *Alexandrium*) bajas. Hace algunos años se produjo en alta mar, en George's Bank un brote grave de PSP que ocasionó el cierre generalizado de todas las pesquerías de almejas de Cabo Hatteras y la muerte de pollos alimentados con huevas de pesquerías de vieiras (Boesch *et al.*, 1997).

Desde el 1 de enero de 2002 se registraron 10 casos de PSP por consumir tamboriles provenientes de aguas cercanas a Titusville, Florida (Anonymous, 2002a).

La costa oeste

En Alaska, los episodios de PSP datan de hace siglos, con los primeros casos informados en 1799. Entre 1973 y 1994 se registraron 66 brotes de PSP y 143 personas enfermas, ocho de ellas presentaron parálisis de una extremidad, ocho fueron sometidas a respiración artificial y dos casos fueron fatales. La mayoría de los brotes ocurrieron durante el período comprendido entre la primavera tardía y el verano (es decir, entre mayo y junio), en la Isla Kodiak (en el extremo sur de la mitad este de las Islas Aleutianas) y en el sudeste de Alaska (Gessner, 1996). Entre mayo y junio de 1994 se produjeron cinco brotes de PSP con 12 personas afectadas, cuatro de las cuales sometidas a respiración artificial, y una de ellas murió. La mayoría había ingerido mejillones, *Mytilus edulis* o *Mytilus californianus* (Gessner y Schloss, 1996; Gessner *et al.*, 1997). En abril de 1995 y en agosto y diciembre de 1997 se produjeron otros tres brotes con tres, cinco y tres pacientes, respectivamente (Anonymous, 1995; 1997a; 1997b).

La historia de las PSP en aguas del noroeste comienza en 1942 con varias muertes que resultaron en el cierre anual del estrecho de San Juan de Fuca y de la costa. En la década de los años 1970 los cierres se extendían desde las Islas San Juan hasta Bellingham. En setiembre de 1978, fuertes lluvias seguidas de un veranillo caluroso resultaron en una serie de casos de PSP que se extendieron desde el pasaje de Sarragoto hasta muy al sur, en la Isla de Vashon. A fines de la década se produjeron brotes recurrentes de *Alexandrium* en la región del Canal Puget, en Washington. En 1988 se detectaron concentraciones de PSP superiores a los límites reglamentarios en mariscos de los canales de Carr, Case y Puget (Boesch *et al.*, 1997 en Determan, 1998). En setiembre de 1994, el promedio de toxinas PSP en el caracol *Polinices lewissii*, un gastrópodo predador, del pasaje Agate, en la cuenca del Canal Puget fue de 145 µg eq de STX/100 g de vísceras. En octubre de 1994 se encontraron concentraciones de 652 µg eq de STX/100 g de cuerpo entero en mejillones comunes, *M. edulis*, en la Bahía Mystery (Wekell *et al.*, 1996). A lo largo de las costas del norte de California y de Oregon, los brotes de PSP también son un problema anual recurrente (Boesch *et al.*, 1997).

2.7.5 América Central y del Sur

Argentina

En el sur de Argentina, las toxinas PSP se han asociado a floraciones de *A. catenella* en el sector argentino del Canal Beagle y a floraciones de *A. tamarensis* en las costas atlánticas, desde el sur, hasta Uruguay (Compagnon *et al.*, 1998). En 1980, en la Península de Valdés se registró la primera floración tóxica de *A. tamarensis*, luego de un episodio en el que dos miembros de la tripulación de un barco murieron por ingerir mejillones contaminados (Ferrari, 2001). Desde entonces, el fenómeno se observa periódicamente en primavera y en verano.

En 1993, durante una floración de *A. tamarensis* muy extensa, sólo se detectó toxicidad en las anchoitas, *Engraulis anchoita*, provenientes de aguas cercanas a Mar del Plata. Las concentraciones de toxinas PSP en esta especie alcanzaron los 101 µg eq de STX/100 g de peso en húmedo de vísceras (determinado por bioensayo en ratón), aunque en el tejido muscular la acumulación de toxinas no alcanzó concentraciones detectables (Montoya *et al.*, 1998).

Compagnon *et al.* (1998) mencionan una floración de *A. catenella* observada en el verano de 1991 y 1992, en la ribera noreste del Canal Beagle, e indican que las concentraciones en mejillones, *Mytilus chilensis*, recolectados el 20 de enero de 1993, fueron de 127 200 µg eq de STX/100 g. Montoya *et al.* (1998) registran la mortandad masiva de caballas, *Scomber japonicus*, en la primavera de 1993, en una zona de la plataforma de Buenos Aires, conocida como Rincón. Aparentemente la mortandad ocurrió debido a la asimilación de toxinas PSP. Las muestras de *A. tamarensis* y de mejillones, *Aulacomya ater*, tomadas entre noviembre de 1995 y mayo de 1996, en ocho estaciones de muestreo en la Península Valdés contenían 490 fmol de toxinas PSP por célula y 631 µg eq de STX/100 g, respectivamente (Andronilo *et al.*, 1999b).

Brasil

En aguas brasileñas se produjeron varios brotes de *A. tamarensis* y se han identificado también otras especies productoras de PSP, a saber *A. catenella* y *G. catenatum*. Desde 1992 se observan floraciones de *A. catenella* y se detecta toxicidad en mariscos todos los años. En 1998 se detectó la presencia de *G. catenatum* en la costa del estado de Santa Catarina (Ferrari, 2001).

Chile

Los primeros informes de PSP por consumo de mejillones en pobladores locales de los alrededores de Ushuaia datan de 1886. *A. catenella* se encuentra principalmente en las tres regiones más al sur de Chile. Entre octubre de 1972 y enero de 1997, en dos de estas tres regiones se registraron 329 casos de PSP, 26 de los cuales fueron fatales por ingerir *Aulacomya ater* y *Mytilus chilensis* con contenidos de toxinas PSP entre 1 555 y 96 000 UR/100 g (Lagos, 1998). Compagnon *et al.* (1998) describen una floración de *A. catenella* a principios de otoño de 1996, en el sur de Chile, con concentraciones de PSP en *A. ater* observadas 25 días después del pico de la floración (de $3,1 \times 10^4$ células por litro) de hasta 113 259 µg eq de STX/100 g de marisco entero. Durante los seis meses posteriores al pico de la floración, las concentraciones disminuyeron, aunque permanecieron altas. También se detectaron concentraciones de toxinas PSP elevadas en dos especies de gastrópodos carnívoros: *Concholepas concholepas* con 9 164 y 737 µg eq de STX/100 g en la glándula digestiva y en el músculo del pie, respectivamente; y en *Argobuccinum ranelliformes* con 14 057 y 31 µg eq de STX/100 g en la glándula digestiva y en el músculo del pie, respectivamente. En gastrópodos carnívoros, las concentraciones máximas se detectaron cinco meses después del pico de la floración.

Hasta 2001, las consecuencias de las toxinas PSP y DSP, tanto para la salud pública y la economía chilena, fueron graves ya que obligaron a cerrar todos los bancos naturales de peces situados al sur de los 44 °S y como consecuencia se puso en práctica un programa nacional de control (Suárez-Isla, 2001). En marzo de 2002 ocurrió una muerte y al menos ocho casos de intoxicación por consumo de mariscos provenientes de la región de Chiloé al sur. Se prohibió cosechar y comercializar mariscos provenientes de toda la zona alrededor de la isla, incluida la comunidad de Ancud situada a 100 km al norte de Chiloé (Carvajal, 2002).

Guatemala

Un brote de PSP ocurrido en 1987 ocasionó 187 casos y 26 muertes por ingerir sopa de almejas. En niños pequeños el porcentaje de casos fatales fue más alto (50 por ciento) que en adultos (un siete por ciento) (Rodrigue *et al.*, 1990).

México

En 1979 se registraron 20 casos de PSP y tres personas murieron por consumir mejillones locales (IPCS, 1984). Un estudio de dos años, de 1984 a 1986, en la Laguna Tamiahua demostró que en los estuarios con bancos de *Crassostrea virginica*, las floraciones permanentes de *Pyrodinium bahamense* se desplazaban de forma hidrodinámica durante la estación de los vientos, entre noviembre y marzo. Se observaron altas densidades de *P. bahamense* en manglares con corrientes de agua lentas, fenómeno que también se observó en las lagunas costeras del Golfo de México y en las de la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an (Gómez-Aguirre y Licea, 1998).

En noviembre de 1989, *P. bahamense* causó un evento tóxico en la costa desde Chiapas hasta Oaxaca, con 99 casos de intoxicación y murieron tres personas por ingerir ostras y mejillones contaminados (Orellana-Cepeda *et al.*, 1998). En mayo de 1992 se encontró un único ejemplar de *Pinna rugosa*, proveniente de la Bahía Concepción, en la Península de Baja California, con una toxicidad por PSP extremadamente elevada, de 23 000 UR/100 g, aunque no se informó de intoxicación en seres humanos (Ochoa *et al.*, 1997).

En el período comprendido entre marzo de 1993 y abril de 1994, en la Bahía Concepción, en el Golfo de California se registraron densidades de 14 000 células de *A. catenella* por litro. Seguidamente se detectaron concentraciones de PSP altas (de hasta 2 400 UR/100 g) en mariscos enteros, principalmente en *Argopecten circularis*. No se permitió cosechar más en la zona, no informándose de intoxicaciones en seres humanos (Lechuga-Devéze y Morquecho-Escamilla, 1998).

Un brote de *P. Bahamense*, que se produjo en aguas próximas a Michoacán y Guerrero desde 1995 hasta 1996 causó la muerte de seis personas y varios casos de intoxicación. En el invierno de 1995, los resultados del bioensayo en ratón de muestras del sudoeste de México revelaron concentraciones de toxinas PSP altas en ostras, *Ostrea iridiscens* entre 608 y 6 337 µg eq de STX/100 g carne; y en almejas, *Donax* sp. 520 µg eq de STX/100 g de carne. En noviembre de 1996 se observó otra floración excepcional de *P. bahamense* en una zona pequeña de la costa mexicana del Pacífico (Orellana-Cepeda *et al.*, 1998).

El 72 por ciento de los eventos tóxicos ocurridos durante el transcurso de la última década del siglo veinte fueron ocasionados por toxinas PSP y solo tres de ellos representan el 87 por ciento de los casos de intoxicación (con 460 individuos intoxicados y 32 casos fatales, incluido el incidente de 1987 en Guatemala). En México, los eventos de PSP causan la muerte de grandes cantidades de animales marinos, como peces y tortugas. En un principio se informó que la única toxina asociada fue la STX producida por *G. Catenatum*, pero desde el evento de 1987 en la costa guatemalteca se determinó que la especie principal de las mareas rojas del sudeste del Pacífico es *G. bahamense* y los componentes principales son dcSTX y STX y solo pequeñas cantidades de GNTX. Sin embargo, el perfil de toxinas en la Península de Baja California es diferente, lo que sugiere que la especie responsable es *A. catenella* o *A. tamiyavanichi* observada recientemente (Sierra-Beltrán *et al.*, 1998).

Trinidad y Tobago

En 1994 se registró por primera vez la presencia de toxinas PSP en Trinidad y Tobago. Los resultados obtenidos tanto por bioensayo en ratones, como por ensayo de unión a un receptor, de muestras de extracto de carne del mejillón *Perna viridis* revelaron una concentración de 28 µg eq de STX/100 g de carne, bastante inferior a los 80 µg/100 g de carne, que se considera la concentración máxima aceptada para consumo humano. No se han registrado casos de intoxicación en humanos (Ammons *et al.*, 2001).

Uruguay

En 1980, en la misma época en que se registraron los incidentes de PSP en Brasil se registraron 60 casos con síntomas neurotóxicos en Uruguay. Si bien se detectaron concentraciones de toxinas PSP altas, nunca se identificó la especie de alga. En el verano de 1991 se produjeron otros brotes de PSP asociados a *G. catenatum*, especie de la que se encontraron densidades altas en sedimentos costeros (Ferrari, 2001).

Venezuela

En 1979 y 1981 se registraron respectivamente 171 y nueve casos de PSP en humanos, con un total de 11 muertes, por ingerir mejillones locales, *Perma perma*, con entre 790 y 33 000 µg eq de STX/kg (IPCS, 1984).

2.7.6 Asia

China

Los primeros casos de PSP revelados en China ocurrieron entre 1967 y 1979 en la Provincia de Zhejiang, con 40 episodios, 23 casos fatales y 423 casos de intoxicación con el caracol marino *Nassarius succinstus* como vector (Zhou *et al.*, 1999). En noviembre de 1986 hubo 136 personas hospitalizadas por PSP y un caso fatal en Dongshan (al sur de la Provincia de Fujian) y la almeja *Ruditapes phillipensis* como vector (Zhou *et al.*, 1999). En febrero de 1989, cinco personas presentaron síntomas de intoxicación con PSP por ingerir la almeja *Pinna pectinata*. En noviembre de 1989, cuatro pescadores presentaron síntomas de PSP por ingerir el caracol *N. succinstus* (proveniente de Fuding en el norte de la Provincia de Fujian) con un caso fatal. Si bien los casos ocurrieron en Huizhou, probablemente el marisco provenía de la Bahía Daya. En marzo de 1991 se registraron cuatro casos de intoxicación y dos muertes por ingerir el mejillón *Perna viridis* proveniente de la Bahía Daya (Zhou *et al.*, 1999).

Un estudio realizado en la Provincia de Guandong, entre 1990 y 1992 reveló la presencia de toxinas PSP en 33 organismos marinos comestibles con concentraciones de hasta 1 000 µg eq de STX/100 g de carne. En junio de 1994, en la Provincia de Zhejiang se registraron cinco casos de intoxicación y un caso fatal por ingerir el caracol *N. succinstus*.

El control de los mariscos de la costa china es mínimo y los episodios descritos probablemente subestimen el alcance real del problema de las PSP. En la actualidad ocurren entre 40 y 50 mareas rojas por año, cifra que en comparación con el par de floraciones registradas en la década de los setenta, muestra que el problema ha cobrado dimensiones alarmantes, y si bien sólo algunas son tóxicas, la tendencia es alarmante y parece estar ligada al aumento de la polución de las aguas costeras chinas registrado en el mismo período. La rápida expansión del cultivo de mariscos y la presencia documentada de algas productoras de PSP en aguas costeras chinas indican que la toxicidad en mariscos continuará siendo un problema grave durante varios años más (Anderson *et al.*, 1996).

El análisis de las muestras de sedimentos tomadas de 49 estaciones, en 14 sitios a lo largo de las costas de los Mares de China Oriental y de China Meridional, para determinar la presencia de quistes de resistencia viables de dinoflagelados reveló la presencia de quistes de *G. catenatum* en la Bahía de Dapeng. Se encontraron quistes de *A. tamarensis* en ocho sitios relativamente contiguos en la boca del Río de las Perlas, en las Provincias de Guangdong y Fujian hasta la Bahía de Taizhou en la Provincia de Zhejiang. Se observó que, en líneas generales, la distribución coincide con las regiones en las que se han registrado eventos de PSP (Qi *et al.*, 1996). Entre 1996 y 1997, de un total de 91 muestras sólo se detectaron toxinas PSP en cuatro de ellas provenientes de tres sitios de muestreo, con una concentración máxima de 79 µg eq de STX/100 g, inferior a la concentración reglamentaria fijada en 80 µg/100 g (Zhou *et al.*, 1999).

Timor-Leste

Llewellyn *et al.* (2002) estudiaron el caso de un hombre, en Timor-Leste, que murió varias horas después de ingerir un cangrejo *Zosimus aeneus*. Los autores determinaron que la concentración total de toxinas en la parte restante del cangrejo fue de 163 µg eq de STX/100 g de tejido (GNTX2, GNTX3 y STX). Calcularon que la dosis ingerida por la víctima fue entre 1 y 2 µg eq de STX/kg de pc pero, como el cangrejo tóxico no fue el único ingrediente de la comida, no descartaron la posibilidad de que otros ingredientes hayan actuado de forma sinérgica con las toxinas PSP.

China, Región Administrativa Especial de Hong Kong

En 1992 se produjeron tres brotes de PSP en la Región Administrativa Especial de Hong Kong, China pero no se dispone de detalles en cuanto al número de pacientes afectados ni los síntomas clínicos. Es probable que la mayoría de los brotes no se informen (Chan, 1995). En una muestra de *Chlamys nobilis*, analizada en setiembre de 1996 se detectó una concentración de 320 µg eq de STX/100 g de tejido. Las concentraciones de toxinas PSP detectadas en *Perna viridis*, 40 días después de la marea roja de marzo y abril de 1998 fueron de hasta 79 µg eq de STX/100 g, pero no se registraron casos de intoxicación en humanos (Zhou *et al.*, 1999).

India

En 1981 se registraron 98 casos de intoxicación con PSP por ingerir mejillones locales, uno de ellos fatal (IPCS, 1984).

Japón

En 1992 se detectaron los primeros mariscos contaminados con PSP en la Bahía de Hiroshima (Hamasaki *et al.*, 1998). A menudo se observa que los bivalvos con importancia industrial, como las vieiras y las ostras, están contaminados con PSP por la presencia de dinoflagelados tóxicos, especialmente *A. catenella*, *A. tamarensis* y *G. catenatum* (Noguchi, 2003).

En el período comprendido entre julio de 1995 y octubre de 1996, seis especies, - *Pecten albicans* (vieira), *Chlamys farreri* (vieira), *Septifer virgatus* (mejillón), *Pinna bicolor*, *Arca boucardi* y *Pseudochama retrove* - de las 30 recolectadas en la Isla Fukue, Prefectura de Nagasaki contenían toxinas PSP. Las concentraciones de toxinas en las dos especies de vieiras (*P. albicans* y *C. farreri*) fueron superiores al límite reglamentario de 400 UR/100 g y sólo se detectó toxicidad en la glándula digestiva. En *P. albicans* se detectó la concentración máxima (de 13 380 UR/g) y en *P. bicolor* se detectó una toxicidad de 490 UR/100 g, superior al límite reglamentario. En las especies *P. retrove*, *A. boucardi* y *S. virgatus* se detectaron las concentraciones más bajas (inferiores al límite reglamentario), 320, 230 y 200 UR/100 g, respectivamente. En cuanto al perfil de toxinas, en 1995 las toxinas principales en la especie *P. albicans* fueron las GNTX; pero en 1996 se encontró que el perfil contenía principalmente compuestos del grupo C de baja toxicidad, como en la especie *C. farreri*. En la especie *Bryocampus* se detectaron concentraciones de PSP bajas, con un perfil compuesto principalmente por dcGNTX2 y GNTX2, además de dcGNTX3 y GNTX3, un perfil bien diferenciado del obtenido de su huésped, *C. farreri* (Takatani *et al.*, 1997).

En marzo de 1997 se registraron 20 casos de intoxicación por ingerir ostras provenientes de la Isla Fukue (Takatani *et al.*, 1997). En 1999 y en 2001 se observó una floración de *A. tamiyavanichii* que afectó varios criaderos de ostras del Mar de la Isla de Seto. Las muestras analizadas el 28 de noviembre de 2001 revelaron la presencia de toxinas PSP en ostras de cultivo y no cultivadas, con una toxicidad de 17,0 y 3,3 UR/g de parte comestible, respectivamente (Nishio, 2003).

Malasia

En 1977 se registraron 201 casos de intoxicación con PSP por ingerir almejas locales, con cuatro casos fatales (IPCS, 1984). Hasta 1990, los problemas relacionados con las PSP eran relativamente simples ya que estaban confinados a la costa oeste de Sabah, en Borneo y la *P. bahamense* identificada como la especie productora de toxinas. Sin embargo, a principios de 1991 se detectó por primera vez la presencia de PSP en la Península de Malasia con tres casos de intoxicación en humanos por ingerir

mejillones de cultivo provenientes de Sebatu, en el estrecho de Malaca, finalmente se confirmó que las toxinas fueron producidas por *A. tamiyanavichi*. A principios de 2000 se detectaron por primera vez toxinas PSP y toxicidad en mariscos en la costa este de Sabah, pero aún no se identificó el productor de toxinas. En setiembre de 2001 se registraron seis casos de intoxicación en seres humanos por ingerir almejas recogidas en una laguna costera de Kelantan, en la costa este de la Península, y una de las víctimas murió. El bioensayo en ratón y el ensayo de unión a un receptor mostraron que las almejas contenían concentraciones de toxinas PSP elevadas. También se encontraron densidades altas de *A. tropicale* y una especie no identificada de *Alexandrium* (Usup y Ahmad, 2001).

Las Filipinas

En 1992 se encontró que los tamboriles (*Arothron mappa*, *A. manillensis*, *A. nigropunctatus*, *A. hispidus*, *A. stellatus*, *A. reticularis*), recolectados contenían cantidades significativas de toxinas PSP, (con STX como el componente principal) y TTX (Sato *et al.*, 2000). Durborow (1999) informa que ese mismo año, los mejillones de cultivo causaron varios casos de PSP en las Filipinas. Van Dolah *et al.* (2001) mencionan que entre 1983 y 1998 se registraron 2 000 casos de PSP con una tasa de mortalidad de 5,8 por ciento.

Taiwán, Provincia de China

En enero de 1986 se registraron dos casos fatales y 30 personas presentaron síntomas por ingerir *Soletellina diphos*. En febrero de 1991 se registraron ocho casos por ingerir la misma especie (Zhou *et al.*, 1999). Los resultados de un estudio realizado entre agosto de 1995 y marzo de 1997 sobre toxinas paráliticas en mariscos de la parte sur de la isla revelan la presencia de PSP y de TTX en tres tipos de mariscos: *Niotha clathrata*, *Natica lineata* y *Natica vitellus* (Liao y Hwang, 2000). En Taiwán, Provincia de China, las especies que contienen PSP son la almeja *Soletellina diphos* (syn. *Hiatula diphos*), los gastrópodos y los cangrejos xántidos, y las algas tóxicas *A. minutum* entre diciembre y marzo (Hwang, 2003).

Tailandia

En 1983 se registraron 62 casos de intoxicación con PSP por ingerir mejillones locales (*Mytilus* spp.), uno de los cuales fue fatal (IPCS, 1984). En 1990 se registró un caso de intoxicación por ingerir un tamboril de agua dulce, *Tetraodon fangi*, la especie parecía contener STX, pero no se detectó la presencia de tetrodotoxina (Sato *et al.*, 1997).

2.7.7 Oceanía

Australia

Entre 1987 y 1997 se realizó el control de toxinas PSP en la Bahía de Port Philip y en la Bahía de Western Port, en Victoria y ocasionalmente se detectaron concentraciones muy elevadas (la concentración máxima fue de 10 000 µg eq de STX/100 g marisco comestible) (ANZFA, 2001).

Nueva Zelanda

En enero de 1993 se produjo un brote de intoxicación por mariscos en Nueva Zelanda con más de 180 casos, además de varios otros de irritación respiratoria causada por toxinas transportadas por el aire desde el mar. En un principio, la toxicidad pareció poseer las características de NSP, ya que las concentraciones de toxinas PSP en la mayoría de los mariscos comercializados no eran muy elevadas, pero posteriormente se determinó que las toxinas PSP producidas por *A. minutum* habían causado al menos una parte de la toxicidad de los mariscos (en las almejas *Paphies australis* y *Paphies subtriangulata*, en vieiras y en mejillones) (MacKenzie *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1997a).

En el período entre enero de 1993 y julio de 1996 se registraron 11 eventos de PSP. El 0,5 por ciento de las muestras de mariscos recogidas semanalmente en ese período, en las costas neocelandesas presentaron concentraciones de toxinas PSP superiores al límite reglamentario (concentración máxima de 920 µg eq de STX/100 g de mejillón), aunque no se registraron casos de intoxicación en seres

humanos (Sim y Wilson, 1997). Durante el verano de 2000 y 2001, las zonas de recolección de mariscos en la costa oeste de la Isla Sur y de la Isla Norte permanecieron cerradas debido a la presencia de *G. catenatum*. La concentración de PSP más alta registrada en Nueva Zelanda fue de 1 007 µg/100 g en 1997, al este de la Bahía Plenty y asociada a la presencia de *A. catenella* (Anonymous, 2003b).

Tasmania

En setiembre de 1994 y en julio de 1996 las concentraciones máximas detectadas en mejillones ostras y vieiras fueron de 18 429, 699 y 83 µg eq de STX/100 g de marisco comestible, respectivamente, con promedios de 636, 123 y 60 µg eq de STX/100 g de marisco comestible, respectivamente (ANZFA, 2001).

2.8 Reglamentación y seguimiento

2.8.1 Reglamentaciones en el mundo

Muchos países ya han adoptado o han propuesto una reglamentación para las PSP. La mayoría considera a las toxinas PSP como un grupo, con límites establecidos en 400 UR/100 g u 80 µg eq de STX/100 g. Otros cuentan con una reglamentación específica para una de las toxinas PSP, generalmente la saxitoxina. Casi toda la reglamentación hace referencia a los mariscos, aunque algunos países establecen que las concentraciones de toxinas PSP máximas permitidas se refieren a un cierto tipo de productos, ya sea a los moluscos en general o específicamente a los bivalvos.

En muchos países, el bioensayo en ratón estándar de la AOAC Internacional continúa siendo el método de análisis utilizado para fines oficiales. Una directiva de la Unión Europea en vigor desde enero de 1993 dispone que el contenido de PSP total en moluscos se determinará según “el método de análisis biológico – al que puede asociarse un método químico de detección de saxitoxina, si fuera necesario. En caso de discrepancia sobre los resultados, el método de referencia deberá ser el método biológico”.

El grado de tolerancia se expresa en distintas unidades de concentración: unidades ratón por g (UR/g) y µg/g (µg/ml con menos frecuencia). Está última parece ser menos apropiada cuando se utiliza el bioensayo en ratón ya que este mide la toxicidad en el ratón; aunque sí sería útil en el hipotético caso que las distintas toxinas PSP tuvieran la misma toxicidad. Si de todas formas se prefiere utilizar µg/g en lugar de UR/g, un factor de equivalencia de toxicidad permite expresar la concentración de las distintas toxinas PSP (si se midieron de forma selectiva), en unidades de concentración de STX (Mons *et al.*, 1998).

2.8.2 Europa

Unión Europea

La Directiva 91/492/CEE de la Unión Europea establece el límite de las toxinas PSP para moluscos bivalvos en 80 µg eq de STX/100 g de carne. El método de análisis oficial es el bioensayo en ratón, al que puede asociarse un método químico de detección, si fuera necesario. En caso de discrepancia sobre los resultados, el método de referencia deberá ser el bioensayo. (EC, 1991a).

La Comisión Europea, una vez obtenidos los resultados de los estudios realizados con *Acanthocardia tuberculatum* (berberechos), aprobó el tratamiento térmico como método de eliminación parcial de las toxinas del molusco. La recolección de esta especie está permitida cuando las concentraciones de toxinas PSP en las partes comestibles se encuentran entre 80 µg eq de STX/100 g de tejido y 300 µg eq de STX/100 g. Si luego del tratamiento térmico, el análisis del producto indica que las concentraciones de STX son inferiores al límite reglamentario de la UE fijado en 80 µg/100 g, el producto es comercializable y apto para consumo humano (EC, 1996). La mayoría de los países de

Europa cuentan con programas de control para verificar la presencia de organismos productores de PSP.

2.8.3 África

Marruecos

El límite de STX en los moluscos es de 80 µg eq de STX/100 g y el método de análisis es el bioensayo en ratón (Fernández, 1998).

2.8.4 América del Norte

Canadá

El límite para el consumo de moluscos es de 80 µg eq de STX/100 g y el bioensayo en ratón es el método de análisis obligatorio. Los productos, como ciertas almejas y mejillones, con concentraciones entre 80 y 160 µg eq de STX/100 g pueden envasarse (Shumway *et al.*, 1995). La almeja amarilla con concentraciones entre 300 y 500 µg eq de STX/100 g se considera apta para comercializar luego de extraer totalmente el sifón, pudiéndose comercializar aquellas con concentraciones entre 80 y 300 µg eq de STX/100 g después de extraer la mitad distal del sifón (Fernández, 1998).

Desde 1988 se recogen muestras de fitoplancton de cuatro estaciones en el oeste de la Bahía de Fundy, al este de Canadá. Las floraciones de *Alexandrium* se observan todos los años entre fines de mayo y agosto, y las concentraciones más altas se detectan generalmente entre el 9 y el 21 de julio. Los planes incluyen un mayor refinamiento, control de la calidad y el estudio en profundidad de la variabilidad temporal y espacial de los patrones de distribución (Martin *et al.*, 2001). Hallegraeff *et al.* (1995) indican que el programa de control de *Alexandrium* spp. vigente dispone el cierre de las zonas de recolección cuando las concentraciones de toxinas en mariscos exceden los límites de tolerancia.

Estados Unidos de América

El límite de toxinas PSP en bivalvos es de 80 µg eq de STX/100 g y el método de análisis utilizado es el bioensayo en ratón (Shumway *et al.*, 1995). La recolección de mariscos con concentraciones de toxinas PSP superiores a 80 µg eq de STX /100 g de tejido está permitida siempre y cuando sean para envasar o se los someta a evisceración (Fernández, 2000).

2.8.5 América Central y del Sur

Argentina

El límite para la STX en los moluscos es de 400 UR/ 100 g y el método de análisis es el bioensayo en ratón. El límite permitido en caracoles de mar para envasar es de 160 µg eq de STX/100 g (Fernández, 1998). Argentina cuenta con un programa nacional de control de toxicidad en mejillones en cada una de las provincias de la costa, del que participan los laboratorios regionales y una estación fija en Mar del Plata (Ferrari, 2001).

Brasil

Brasil puso en práctica una iniciativa de control piloto de un año de duración, pero no cuenta con un programa nacional de control (Ferrari, 2001).

Chile

El límite de STX en los moluscos es de 80 µg eq de STX/100 g y el método de análisis es el bioensayo en ratón (Fernández, 1998). Hasta 2001, las consecuencias de las toxinas PSP y DSP, tanto en la salud pública como en la economía chilena fueron graves ya que obligaron a cerrar todos los bancos

naturales de peces situados al sur de los 44 °S y se puso en práctica un programa nacional de control (Suárez-Isla, 2001).

Guatemala

El límite de STX en moluscos es de 80 µg eq de STX/100 g y el método de análisis es el bioensayo en ratón (Fernández, 1998).

México

El límite reglamentario es de 30 µg eq de STX/100 g y el método de análisis es el bioensayo en ratón (Aune, 2001).

Panamá

El límite de toxinas PSP en bivalvos es de 400 UR/100 g y el método de análisis es el bioensayo en ratón (Shumway *et al.*, 1995).

Uruguay

El límite de STX en moluscos es de 400 UR/100 g y el método de análisis es el bioensayo en ratón (Fernández, 1998). El país cuenta con un programa nacional de control de toxicidad en mejillones y de fitoplancton tóxico (Ferrari, 2001).

Venezuela

El límite de STX en moluscos es de 80 µg eq de STX/100 g y el método de análisis es el bioensayo en ratón (Fernández, 1998).

2.8.6 Asia

China, Región Administrativa Especial de Hong Kong

El límite de toxinas PSP en mariscos es de 400 UR/100 g y el método de análisis es el bioensayo en ratón (Shumway *et al.*, 1995).

Japón

El límite de toxinas PSP en los bivalvos es de 400 UR/100 g y el método de análisis es el bioensayo en ratón (Shumway *et al.*, 1995).

Malasia

Los problemas relacionados con PSP eran relativamente simples hasta 1990 ya que estaban confinados a la costa oeste de Sabah, en Borneo. El Ministerio de Pesca de Malasia puso en práctica un eficaz programa de control de la toxicidad en mariscos, que redujo los casos de PSP a pesar de la presencia recurrente de floraciones de algas. Un incidente con PSP ocurrido en 1991, en la Península de Malasia, asociado al consumo de mejillones de Sebatu en el Estrecho de Malaca, impulsó al gobierno a abrir otra estación de control de toxicidad en mariscos en el Instituto de Investigación Pesquera, en Penang. En setiembre de 2001 se registraron casos de PSP por ingerir almejas provenientes de la costa este de la Península. Desde punto de vista logístico se justifica la apertura de una estación de control de toxicidad en mariscos en la costa este de la Península de Malasia (Usup y Ahmad, 2001).

Las Filipinas

El límite de tolerancia es de 40 µg eq de STX/100 g (Aune, 2001).

Singapur

El límite de toxinas STX en bivalvos es de 80 µg/100 g y el método de análisis es el bioensayo en ratón (Shumway *et al.*, 1995).

República de Corea

El límite de gonyautoxinas en bivalvos es de 400 UR/100 g y el método de análisis es el bioensayo en ratón y la CL (Shumway *et al.*, 1995).

2.8.7 Oceanía

Australia

El límite es de 80 µg eq de STX/100 g de carne de marisco y el método de análisis es el bioensayo en ratón (Shumway *et al.*, 1995).

Nueva Zelanda

El Programa de Control de Biotoxinas Neocelandés combina los análisis de mariscos comunes y el control del fitoplancton. El límite reglamentario es de 80 µg eq de STX/100 g de carne de marisco (Sim y Wilson, 1997). En la actualidad se utiliza el bioensayo en ratones como método de análisis primario seguido de ensayos de confirmación (Busby y Seamer, 2001).

El proyecto de Programa de Control de Biotoxinas está diseñado para suministrar información sumamente precisa, en tiempos más cortos y mediante técnicas de CL acoplada a EM que sustituyan al bioensayo en ratón y provean información analítica y química en lugar de resultados de análisis por bioensayo. Actualmente se está trabajando en el desarrollo y la puesta en práctica de nuevos métodos de ensayo, se estudian las distintas alternativas de financiamiento, la validación de los métodos, la reglamentación de los análisis y la disponibilidad de estándares analíticos. Además se realiza la comparación con las pruebas existentes, se evalúan las distintas estrategias para ponerlo en práctica y se exploran las posibilidades de cooperación internacional (McNabb y Holland, 2001).